



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του επαγόμενου από την  
υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α**

**Δισερή Αικατερίνη**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Λιάκος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Επιβλέπων
- Σίμος Γεώργιος, Καθηγητής Βιοχημείας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως  
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη  
Βιοχημεία

Λάρισα, Οκτώβριος, 2018



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**  
**"Study of the molecular mechanisms regulating hypoxia inducible transcrip-  
tion factor HIF-2 $\alpha$ "**

Diseri Aikaterini

Advisory Thesis Committee:

- Liakos Panagiotis, Associate Professor of Medical Biochemistry, Supervisor
- Simos George, Professor of Biochemistry
- Germenis Anastasios, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry

Larissa, October, 2018

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, κ.Λιάκο Παναγιώτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας, κ.Λιάκο Παναγιώτη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην ομάδα του και να δουλέψω μαζί τους καθώς και για την αμέριστη ψυχολογική και ηθική συμπαράσταση καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις γνώσεις που μου πρόσφερε καθώς και για την απλόχερη βοήθεια και τις συμβουλές του σε όλη την πορεία των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τον Καθηγητή Βιοχημείας, κ.Σίμο Γεώργιο, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας για την ευκαιρία να εργαστώ και να διδαχθώ στο χώρο του εργαστηρίου, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας κ.Γερμενή Αναστάσιο για τη δημιουργία και συντονισμό ενός τόσο ενδιαφέροντος προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών και καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να διδαχθώ και να μάθω μέσα από διαλέξεις επιστημόνων με υψηλό ακαδημαϊκό και ερευνητικό υπόβαθρο στο ενεργητικό τους.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτωρ κα.Γκοτινάκου Ιωάννα για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών τεχνικών στο εργαστήριο Βιοχημείας. Την ευχαριστώ για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφερε από την έναρξη του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, οι οποίες συνεισέφεραν θετικά στην επιτυχή διεκπεραίωση και εμπέδωση των πειραματικών τεχνικών που διδάχθηκα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω πέραν αυτού, και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα.Μπεφάνη Χριστίνα, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις της και την βοήθειά της στην όλη πειραματική πορεία μου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά όλα τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Βιοχημείας για τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των μαθημάτων στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών και την προθυμία τους για την επίλυση οποιουδήποτε ακαδημαϊκού θέματος.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας, δηλαδή τους υποψήφιους διδάκτορες κα.Καραγιώτα Αγγελική, κ.Κουκουλά Κρέων, κα.Ταζέ Χρύσα και κ.Υφαντή Άγγελο που με καλοδέχτηκαν από την πρώτη στιγμή στο εργαστήριο και με το φιλικό και χαρούμενο πνεύμα τους συντέλεσαν στην ομαλή πορεία των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα.Αγγελή Αντωνία, με την οποία ξεκινήσαμε μαζί τις μεταπτυχιακές μας σπουδές και αποτέλεσε σημαντικό ψυχολογικό και

ηθικό στήριγμα καθ' όλη την διάρκειά τους.

Τέλος, εγκάρδιες ευχαριστίες οφείλω σε όλη μου την οικογένεια που βρίσκεται πάντα δίπλα μου και με στηρίζει σε κάθε μου βήμα. Τους ευχαριστώ που με το ήθος και τους τρόπους που μου δίδαξαν με βοήθησαν να αντιμετωπίζω κάθε δύσκολη κατάσταση.

Δισερή Αικατερίνη,

Χημικός

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α είναι ένας από τους βασικούς ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία. Συμμετέχει τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις, όπως η ανάπτυξη, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος και η φλεγμονή. Ο HIF-2α δρα ως ετεροδιμερές σύμπλοκο μαζί με τη συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β ή ARNT. Η ρύθμιση της HIF-2α υπομονάδας περιλαμβάνει μηχανισμούς που εξαρτώνται από το οξυγόνο καθώς και ανεξάρτητους από αυτό, όπως μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Στην παρούσα διπλωματική ερευνητικής εργασίας μελετήθηκαν οι μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α.

Το πρώτο μέρος της εργασίας επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης του προφλεγμονώδη παράγοντα TNF-α σε συνθήκες υποξίας στη ρύθμιση του HIF-2α σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος και του τραχήλου της μήτρας. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η επώαση με τον TNF-α μειώνει την μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-2α χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά του επίπεδα σε συνθήκες υποξίας. Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός της παραπάνω δράσης του TNF-α μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α με πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών δεν έδειξαν καμία μεταβολή στον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-2α, γεγονός που δεν δικαιολογεί τη μείωση της μεταγραφικής δράσης του HIF-2α παρουσία του TNF-α. Έτσι, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ARNT με πείραμα ανοσοκατακρήμνισης όπου διαπιστώθηκε ότι παρουσία του TNF-α μειώνεται η αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ARNT χωρίς να μεταβάλλει την έκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ARNT. Συμπερασματικά, το πρώτο μέρος της εργασίας δείχνει για πρώτη φορά και προτείνει ως μοριακό μηχανισμό, μέσω του οποίου ο TNF-α μειώνει τη μεταγραφική δράση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας, την ελάττωση της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με τον ARNT στον πυρήνα.

Το δεύτερο μέρος της εργασίας επικεντρώθηκε σε ένα ερώτημα από πρόσφατα αδημοσίευτα αποτελέσματα της ομάδας μας. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στην θέση Ser672 από τις ERK1/2, με αποτέλεσμα η φωσφορυλίωση αυτή να καλύπτει ένα γειτονικό στη Ser672 σήμα πυρηνικής εξόδου NES, να παρεμποδίζεται η σύνδεση του HIF-2α με την εξπορτίνη CRM1 και η έξοδός του από τον πυρήνα. Στη συνέχεια με πειράματα μεταλλαξιγένεσης στον πλήρους μεγέθους αγρίου τύπου HIF-2α διαπιστώθηκε ότι η αλληλουχία είναι αναγκαία για την έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η αλληλουχία αυτή είναι επαρκής για να αποτελεί ένα λειτουργικό NES. Για το λόγο αυτό το τμήμα 640-679 του αγρίου τύπου HIF-2α καθώς και των μεταλλαγμάτων του κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα p-EGFP-C1, εκφράστηκαν στα κύτταρά μας και ελέγχθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης βρέθηκε ότι η CRM1 αλληλεπιδρά λιγότερο με τα μεταλλάγματα που φέρουν μετάλλαξη στην πιθανή αλληλουχία του σήματος πυρηνικής εξόδου, LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679), και περισσότερο με το μετάλλαγμα στο οποίο αναιρείται η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2, το SA-HIF-2α(640-679). Συμπερασματικά, το δεύτερο μέρος της εργασίας δείχνει ότι η γειτονική στη Ser672 αλληλουχία διαφαίνεται να είναι επαρκής για να αποτελεί ένα λειτουργικό NES του HIF-2α.

Λέξεις κλειδιά: HIF-2α, υποξία, TNF-α, ARNT, ERK1/2, NES

## ABSTRACT

Hypoxia-induced transcription factor HIF-2 $\alpha$  is one of the key regulators of the cellular response to hypoxia. It participates in physiological conditions, such as growth, and in pathological conditions, such as cancer and inflammation. HIF-2 $\alpha$  acts as a heterodimeric complex along with the continuously expressed HIF-1 $\beta$  or ARNT subunit. The regulation of the HIF-2 $\alpha$  subunit involves oxygen-dependent and independent mechanisms, such as by post-translational modifications. In this thesis, the molecular mechanisms of regulation of hypoxia-induced transcription factor HIF-2 $\alpha$  have been studied.

The first part of this thesis focused on the study of the effect of TNF- $\alpha$  proinflammatory agent on hypoxia conditions in the regulation of HIF-2 $\alpha$  in liver and cervical cancer cells. In particular, it was found that incubation with TNF- $\alpha$  reduces the transcription of target genes of HIF-2 $\alpha$  without, however, affecting its protein levels under hypoxia conditions. In order to investigate the mechanism of TNF- $\alpha$  activity, subcellular localization of HIF-2 $\alpha$  was studied by immunofluorescence experiments. The results of these experiments showed no change in the nuclear localization of HIF-2 $\alpha$ , which does not justify the reducing of the transcriptional activity of HIF-2 $\alpha$  in the presence of TNF- $\alpha$ . Thus, the interaction of HIF-2 $\alpha$  with ARNT was investigated by an immunoprecipitation experiment where it was found that the presence of TNF- $\alpha$  decreases the interaction of HIF-2 $\alpha$  with ARNT without altering the expression of ARNT protein levels. In conclusion, the first part of the study shows for the first time and suggests a molecular mechanism by which TNF- $\alpha$  reduces the transcriptional activity of HIF-2 $\alpha$  under hypoxic conditions, reducing the interaction of HIF-2 $\alpha$  with ARNT in the nucleus.

The second part of this work focused on a question from recently unpublished results of our group. Our results indicate that HIF-2 $\alpha$  is phosphorylated at the Ser672 site by ERK1/2, this phosphorylation resulting in covering a nuclear signal exit NES adjacent to Ser672, inhibiting the binding of HIF-2 $\alpha$  to the exportin CRM1 and the exit from the nucleus. Subsequent mutagenesis experiments on full-length wild-type HIF-2 $\alpha$  revealed that the sequence was necessary for the exit of HIF-2 $\alpha$  from the nucleus. In the context of this work, we wanted to check whether this sequence is sufficient to constitute a functional NES. For this reason, fragment 640-679 of the wild-type HIF-2 $\alpha$  and its mutants was cloned into the plasmid vector p-EGFP-C1, expressed in our cells and their subcellular localization was checked. With immunoprecipitation experiments found that CRM1 interacts less with the mutants LA-HIF-2 $\alpha$  (640-679) and SA / LA-HIF-2 $\alpha$  (640-679), and more with SA-HIF-2 $\alpha$  (640-679). In conclusion, the second part of the work shows that the sequence adjacent to the Ser672 appears to be sufficient to constitute a functional NES of HIF-2 $\alpha$ .

**Keywords:** HIF-2 $\alpha$ , hypoxia, TNF- $\alpha$ , ARNT, ERK1/2, NES

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTARCT .....</b>	<b>6</b>
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>10</b>
1.1 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF .....	11
1.2 Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α .....	11
1.3 Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α.....	11
1.4 Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-3α.....	13
1.5 HIF-1β ή ARNT.....	13
1.6 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α.....	13
1.6.1 Ρύθμιση μέσω υδροξυλίωσης.....	13
1.7 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α .....	14
1.7.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής .....	14
1.7.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης.....	15
1.7.3 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σταθερότητας.....	16
1.7.4 Ρύθμιση από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	17
1.7.4.1 Ακετυλίωση.....	17
1.7.4.2 Σουμοϋλίωση .....	17
1.7.4.3 Φωσφορυλίωση .....	17
1.7.4.4 Η οικογένεια των κινασών που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK) .....	18
1.7.5 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες .....	20
1.7.5.1 ELK-1.....	21
1.7.5.2 NEMO.....	21
1.7.5.3 USF2.....	21
1.7.5.4 c-MYC .....	21
1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	22
1.8.1 Φλεγμονή .....	22
1.8.2 Ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) .....	23
<b>2.ΣΚΟΠΟΣ .....</b>	<b>26</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Κυτταρικές σειρές.....	27

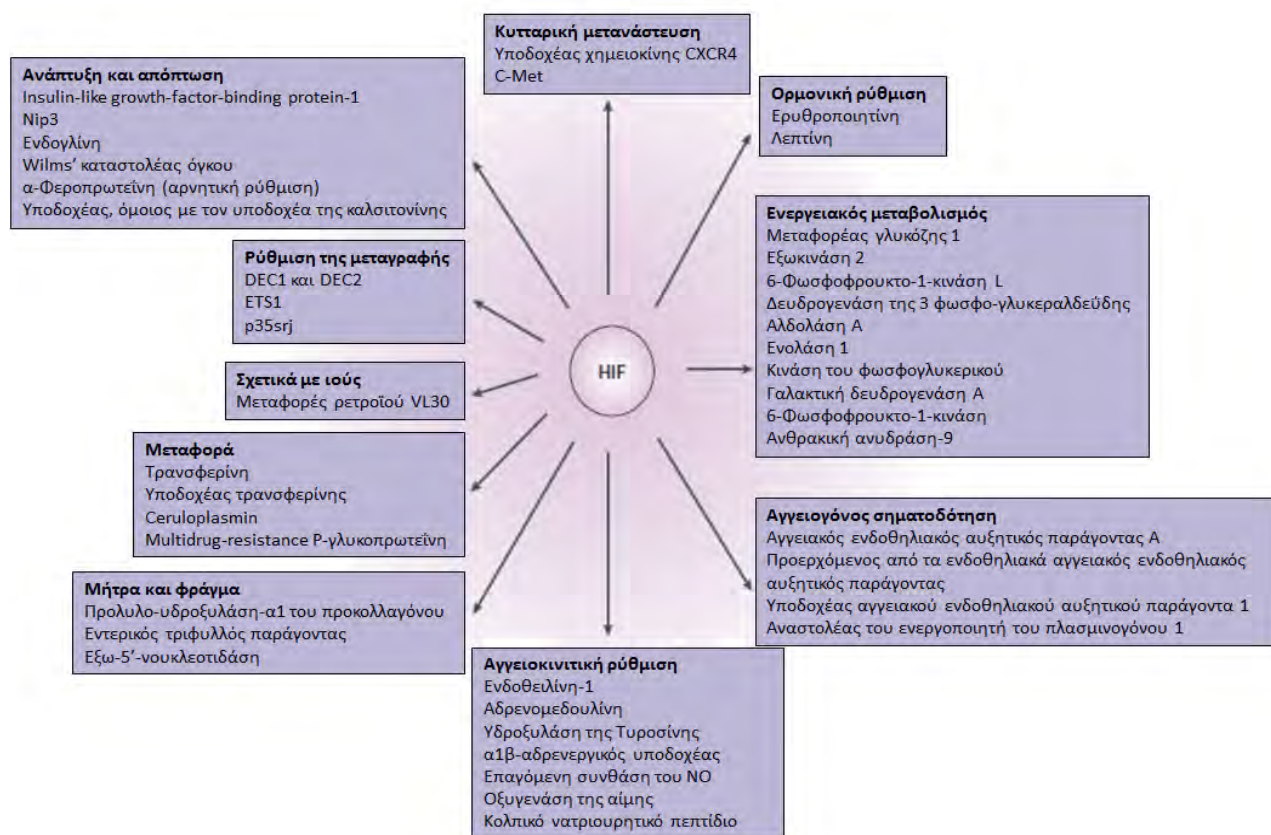
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη.....	27
3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας .....	27
3.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς .....	27
3.1.5 Εκκινητές.....	29
3.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια.....	30
3.1.7 Υλικά Μοριακής Βιολογίας.....	30
3.1.8 Αντισώματα .....	30
3.1.9 Ένζυμα.....	30
<b>3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες .....	31
3.2.2 Επίδραση ουσιών και μελέτη της επαγωγής του HIF-2α .....	31
3.2.3 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος .....	31
3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	31
3.2.5 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση .....	32
3.2.6 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).....	33
3.2.7 Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας .....	34
3.2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του .....	34
3.2.7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, RT-PCR)....	34
3.2.8 Απομόνωση και πολλαπλασιασμός τμημάτων της αλληλουχίας cDNA του HIF-2α με PCR.....	37
3.2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης .....	38
3.2.10 Κλωνοποίηση των τμημάτων cDNA που κωδικοποιούν την αμινοξική αλληλουχία 640-679 του HIF-σε πλασμιδιακό φορέα.....	39
3.2.10.1 Πέψεις.....	39
3.2.10.2 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).....	40
3.2.10.3 Αντίδραση λιγάσης (ligation) .....	41
3.2.10.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων .....	41
3.2.10.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation) .....	42
3.2.10.6 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (έλεγχος εισαγωγή ενθέματος και έλεγχος προσανατολισμού.....	43
3.2.10.7 Έλεγχος προσανατολισμού του ενθέματος με PCR.....	43
3.2.11 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	44
3.2.12 Φθορισμός.....	45
3.2.13 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων .....	45



3.2.14 Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation, IP).....	46
3.2.15 Αλληλούχιση.....	47
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>48</b>
4.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΟΝ TNF-α.....	48
4.1.1 Επίδραση του παράγοντα TNF-α στην έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α στην υποξία.....	48
4.1.2 Επίδραση του παράγοντα TNF-α στην έκφραση γονιδίων στόχων του HIF-2α σε υποξία.....	48
4.1.3 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-2α υπό την επίδραση του TNF-α.....	49
4.1.4 Επίδραση του TNF-α στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ARNT.....	51
4.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ 640-679 ΤΟΥ HIF-2α ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΓΙΑ ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ NES.....	53
4.2.1 Κλωνοποίηση του τμήματος cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 640-679 του HIF-2α .....	53
4.2.2 Έλεγχος της έκφρασης των κλωνοποιημένων τμημάτων του HIF-2α (640-679).....	56
4.2.3 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των κλωνοποιημένων τμημάτων WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679) με την εξαπορτίνη 1 (CRM1).....	58
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>60</b>
5.1 Μελέτη της επίδρασης του TNF-α στον HIF-2α.....	60
5.2 Λειτουργική μελέτη των μεταλλαγμάτων του HIF-2α που καταργούν το πιθανό NES.....	62
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>63</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) είναι κυρίαρχο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής, λόγω της χρησιμότητάς του στη διαδικασία της αναπνοής. Το  $O_2$  δρα ως ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στην διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπου ωστόσο η υπερβολική συγκέντρωση του φέρει το κίνδυνο της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που αντιδρούν με τα κυτταρικά μακρομόρια και αλλάζουν τις βιοχημικές ή φυσικές τους ιδιότητες με αποτέλεσμα την κυτταρική δυσλειτουργία και το θάνατο. Η μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου (υποξία) μπορεί να προκύψει σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως η άσκηση, η εμβρυϊκή ανάπτυξη, το μεγάλο υψόμετρο, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, το έμφραγμα και ο σχηματισμός συμπαγών όγκων (1). Ως αποτέλεσμα, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει περίτεχνα κυτταρικά και φυσιολογικά συστήματα με σκοπό την διατήρηση της ομοιοστασίας του οξυγόνου, ώστε να προσαρμόζονται και να ανταπεξέρχονται στις μεταβολές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Οι κύριοι ρυθμιστές της απόκρισης στην υποξία είναι οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia-Inducible Factors, HIFs) οι οποίοι προστατεύουν τα κύτταρα επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον αναερόβιο μεταβολισμό, στην ερυθροποίηση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1: Μεταγραφικοί στόχοι των HIFs.** Η εικόνα παρουσιάζει τα πρωτεϊνικά παράγωγα των γονιδίων που αποτελούν άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων (HIF) και συμμετέχουν σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση, η απόπτωση, η μετανάστευση και ο μεταβολισμός (2).

### **1.1 Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF**

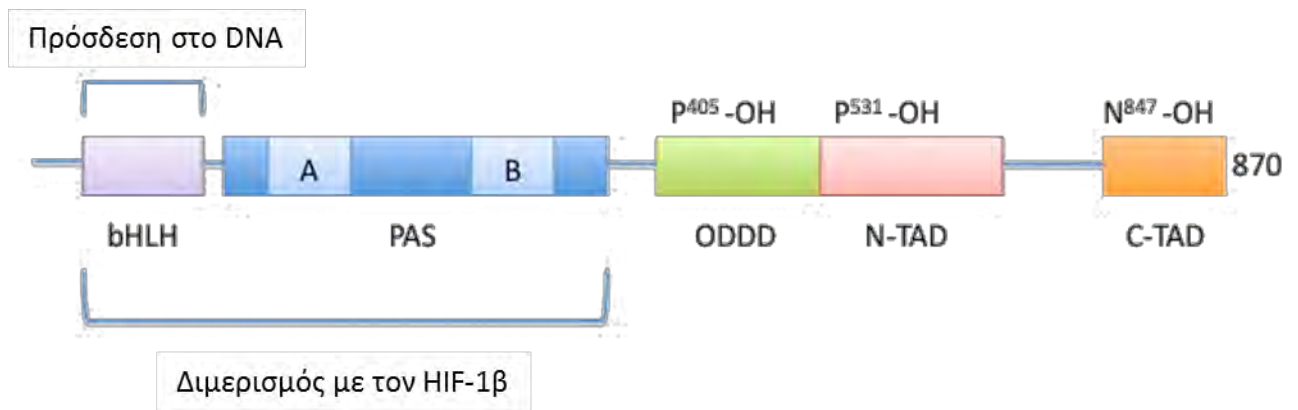
Η οικογένεια των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF, αποτελείται από τους HIF-1, HIF-2 και HIF-3. Οι HIF δρουν ως ετεροδιμερή αποτελούμενοι από μία ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο άλφα υπομονάδα και μια συνεχώς εκφραζόμενη βήτα υπομονάδα, τον HIF-1β ή ARNT **(3)**. Οι HIF υπομονάδες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών με δομή έλικας-στροφής-έλικας (basic helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM, bHLH/PAS) **(4)**. Το μοτίβο bHLH-PAS είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ των α και β υπομονάδων, καθώς και για την πρόσδεση στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, HREs) στις αλληλουχίες DNA των γονιδίων στόχων.

### **1.2 Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α**

Ο HIF-1α είναι μια πρωτεΐνη 826 αμινοξέων με υψηλά συντηρημένη αλληλουχία. Περιέχει στην αμινοτελική του περιοχή τα πρωτεϊνικά μοτίβα bHLH-PAS που απαιτούνται για τον διμερισμό με τον ARNT και την πρόσδεση στο DNA, διαθέτει δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD, αμινοξέα 531-575 και C-TAD, αμινοξέα 831-826). Η N-TAD περιοχή επικαλύπτεται με την ODDD περιοχή (αμινοξέα 401-603) και παίζει ρόλο στην οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση της πρωτεΐνης **(5)**. Εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους, επάγεται σε συνθήκες υποξίας και στους εξειδικευμένους μεταγραφικούς στόχους του περιλαμβάνονται γονίδια εμπλέκονται στον μεταβολισμό (PGK1), στην απόπτωση (BNIP3) και στη ρύθμιση του pH (CA1X).

### **1.3 Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α**

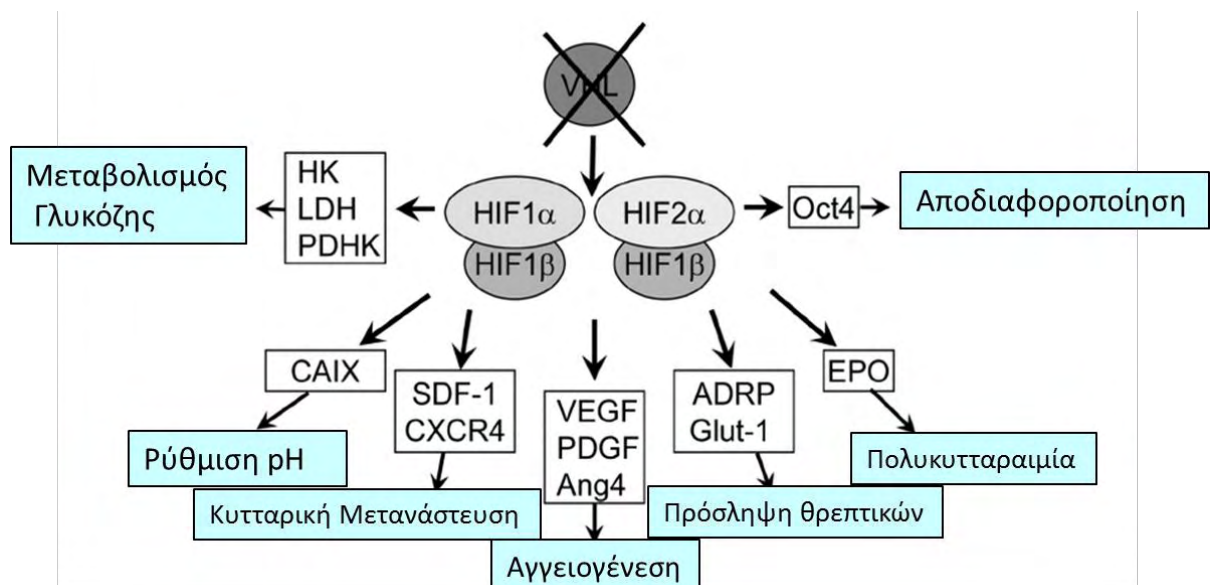
Ο HIF-2α είναι μια πρωτεΐνη 870 αμινοξέων, γνωστή από την βιβλιογραφία και ως Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1) **(6)** ή HIF-related factor (HRF) **(7)** ή member of PAS family 2 (MOP2) **(8)**. Στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχεται η επικράτεια HLH και η PAS επικράτεια. Διαθέτει επίσης δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής, μία αμινοτελική (N-TAD) και μία καρβοξυτελική (C-TAD), οι οποίες αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές όπως οι CBP/p300 και είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική του δράση **(9)**. Ανάμεσα στις επικράτειες N-TAD και C-TAD παρεμβάλλεται και η ανασταλτική επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (Inhibitory Domain, ID). Φέρει επίσης μια οξυγονο-εξαρτώμενη επικράτεια (ODDD) η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του σε συνθήκες νορμοξίας **(10)**. Τέλος, για τον HIF-2α έχουν βρεθεί δύο πιθανά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals, NLS), τα N-NLS (αμινοξέα 14-50) και C-NLS (αμινοξέα 705-742) **(11)**.



**Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης του HIF-2α.** Η πρωτεΐνη του HIF-2α αποτελείται από 870 αμινοξέα και φέρει μια basic-helix-loop-helix περιοχή, μια εξαρτώμενη από το οξυγόνο περιοχή (ODDD) και δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (N-TAD και C-TAD) (12, <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/EPAS1ID44088ch2p21.html>).

Ο HIF-2α εκφράζεται ιστοειδικά και κυρίως στο ενδοθήλιο, στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στα νεφρά, στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στο επιθήλιο του παχέος εντέρου (13). Στον πυρήνα ο HIF-2α συγκεντρώνεται σε συγκεκριμένες δομές (speckles) κοντά στην ενεργή RNA πολυμεράση, γεγονός που του προσδίδει καλύτερη πρόσβαση στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του (14).

Στα γονίδια στόχους του HIF-2α περιλαμβάνονται γονίδια που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση (EPO), στην αντιοξειδωτική άμυνα (SOD2), στη διαφοροποίηση (OCT4), στον πολλαπλασιασμό (TGF-α, Cyclin D1) και στη διηθητικότητα (MMP2, PAI-1).



**Εικόνα 3: Ο HIF-1α και ο HIF-2α ρυθμίζουν ανεξάρτητα αλλά αλληλεπικαλυπτόμενα γονίδια στόχους.** Τα κοινά γονίδια στόχοι τους περιλαμβάνουν την ρύθμιση του pH, την κυτταρική μετανάστευση, την αγγειογένεση, την πρόσληψη θρεπτικών και την παραγωγή ερυθροκυττάρων. Αποκλειστικοί στόχοι του HIF-1 αποτελούν ένζυμα που συμμετέχουν στην γλυκόλυση, ενώ για παράδειγμα η EPO αποτελεί ανεξάρτητο στόχο του HIF-2 (15).

## **1.4 Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-3α**

Ο HIF-3α είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει 6 ισομορφές και δεν φέρει περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής C-TAD (16). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το ρόλο του στην υποξία είναι ασαφή καθώς έχει προταθεί ότι ανταγωνίζεται τους HIF-1α και HIF-2α για την πρόσδεση στον ARNT και τους απενεργοποιεί (17), ωστόσο πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (18).

## **1.5 HIF-1β ή ARNT**

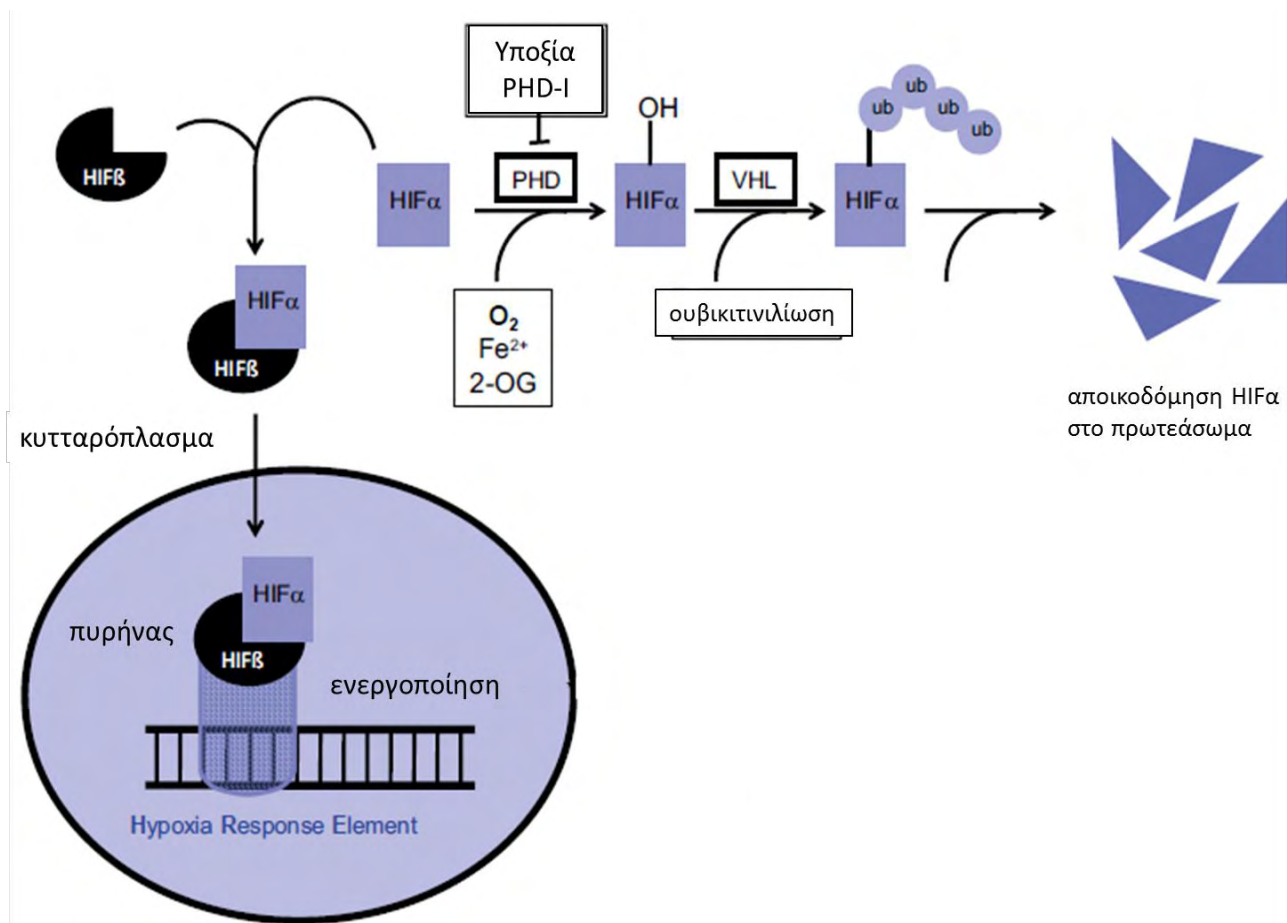
Ο HIF-1β είναι μια πρωτεΐνη 789 αμινοξέων που αποτελείται από δύο ισομορφές (ARNT, ARNT2) (19). Περιέχει μια επικράτεια bHLH απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA, δύο επικράτειες PAS υπεύθυνες για τον διμερισμό του και μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (20). Ο ARNT συμμετέχει σε δύο διακριτές σηματοδοτικές οδούς ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες: στην οδό του υποδοχέα AhR (aryl hydrocarbon receptor) σε συνθήκες έκθεσης σε διοξίνες και στη οδό των HIF σε συνθήκες υποξίας (21).

## **1.6 ΟΞΥΓΟΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α**

### **1.6.1 Ρύθμιση μέσω υδροξυλίωσης**

Σε συνθήκες νορμοξίας, οι HIF άλφα υπομονάδες συνεχώς μεταγράφονται και μεταφράζονται. Η οικογένεια των προλ-4-υδροξυλασών (Prolyl Hydroxylase Domain, PHD1-4), κυρίως η PHD2, υδροξυλιώνει τις ευαίσθητες στο οξυγόνο άλφα υπομονάδες (22), (23). Οι PHDs απαιτούν σίδηρο, α-κετογλουταρικό, ασκορβικό και μοριακό οξυγόνο προκειμένου να υδροξυλιώσουν διατηρημένα κατάλοιπα προλίνης (HIF-2α: Pro-405 και Pro-531) (24), τα οποία εντοπίζονται στο γενικό μοτίβο LXXLAP στην επικράτεια ODD (25). Η τροποποίηση αυτή επιτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel Lindau (VHL), που ανήκει στο σύμπλοκο της λιγάσης της ουβικιτίνης E3 και η οποία πολυ-ουβικιτινυλιώνει τις άλφα υπομονάδες σηματοδοτώντας την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα (26). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι PHD2 και PHD3 αποτελούν γονίδια στόχους των HIF, το οποίο υποδηλώνει ένα πιθανό μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης του μονοπατιού.

Οι HIF αποτελούν στόχο μίας επιπλέον ρυθμιστικής υδροξυλίωσης. Ένα ένζυμο γνωστό ως ανασταλτικός παράγοντας του HIF (Factor Inhibiting HIF, FIH) υδροξυλιώνει μια ασπαραγίνη (HIF-2α: Asn-847) στην C-TAD επικράτεια, παρεμποδίζοντας την προσάραξη του μεταγραφικού συμπαράγοντα CBP/p300, με αποτέλεσμα να εξασθενεί η μεταγραφική δράση των HIF και η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του (27).



**Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των επαγόμενων από την υποξία μεταγραφικών παραγόντων HIF.** Η προλινυδροξυλάσες (PHDs) δρουν ως αισθητήρες οξυγόνου και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες προάγουν την αποικοδόμηση των HIF στο πρωτεάσωμα, μετά την πρόσδεση της λιγάσης της ουβικιτίνης VHL. Η υποξία αναστέλλει τις PHDs και οδηγεί σε σταθεροποίηση της HIF-α υπομονάδας, ετεροδιμερισμό με τον ARNT και μετατόπιση στον πυρήνα, όπου προσδένονται στα HRE και ενεργοποιούν γονίδια στόχους (28)

Σε συνθήκες υποξίας ωστόσο, τα συμβάντα υδροξυλίωσης αναστέλλονται λόγω της απενεργοποίησης των PHDs και του FIH, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του HIF και την ανάκτηση της πλήρους μεταγραφικής του δράσης.

## 1.7 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-2α

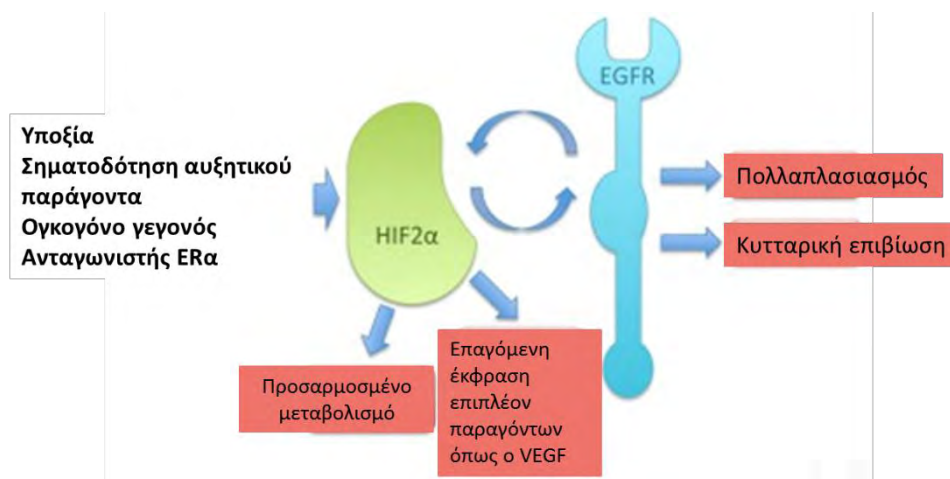
### 1.7.1 Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι γνωστά για τη ρύθμιση του HIF-2α στο επίπεδο της μεταγραφής. Μια μελέτη υποστηρίζει ότι στα μακροφάγα, υπάρχει διαφορετική ενεργοποίηση και ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ισομορφών HIF, με τελικό αποτέλεσμα τη διατήρηση της ομοιοστασίας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (29). Συγκεκριμένα στα πολωμένα μακροφάγα τύπου M2 επάγεται το mRNA του HIF-2α από τις ιντερλευκίνες IL-4 και IL-10 οδηγώντας σε επαγωγή της αργινάσης 1 και καταστολή της σύνθεσης του NO, ενώ στα πολωμένα μακροφάγα τύπου M1 επάγεται το mRNA του HIF-1α από την ιντερφερόνη γ οδηγώντας σε σύνθεση του NO



(29).

Επιπλέον, σύμφωνα με τα δεδομένα μιας πρόσφατης έρευνας έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα mRNA του HIF-2α αυξάνονται σε κύτταρα καρκίνου του μαστού ανθεκτικά σε αντι-οιστρογόνα, μέσω ενός μηχανισμού που συνδέει τον HIF-2α και τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (30). Πιο συγκεκριμένα, με αποσιώπηση του EGFR παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-2α, το οποίο αποδόθηκε στην αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGF. Επίσης, η αποσιώπηση του HIF-2α είχε ως αποτέλεσμα την μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του EGFR δείχνοντας τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. (Εικόνα 5)

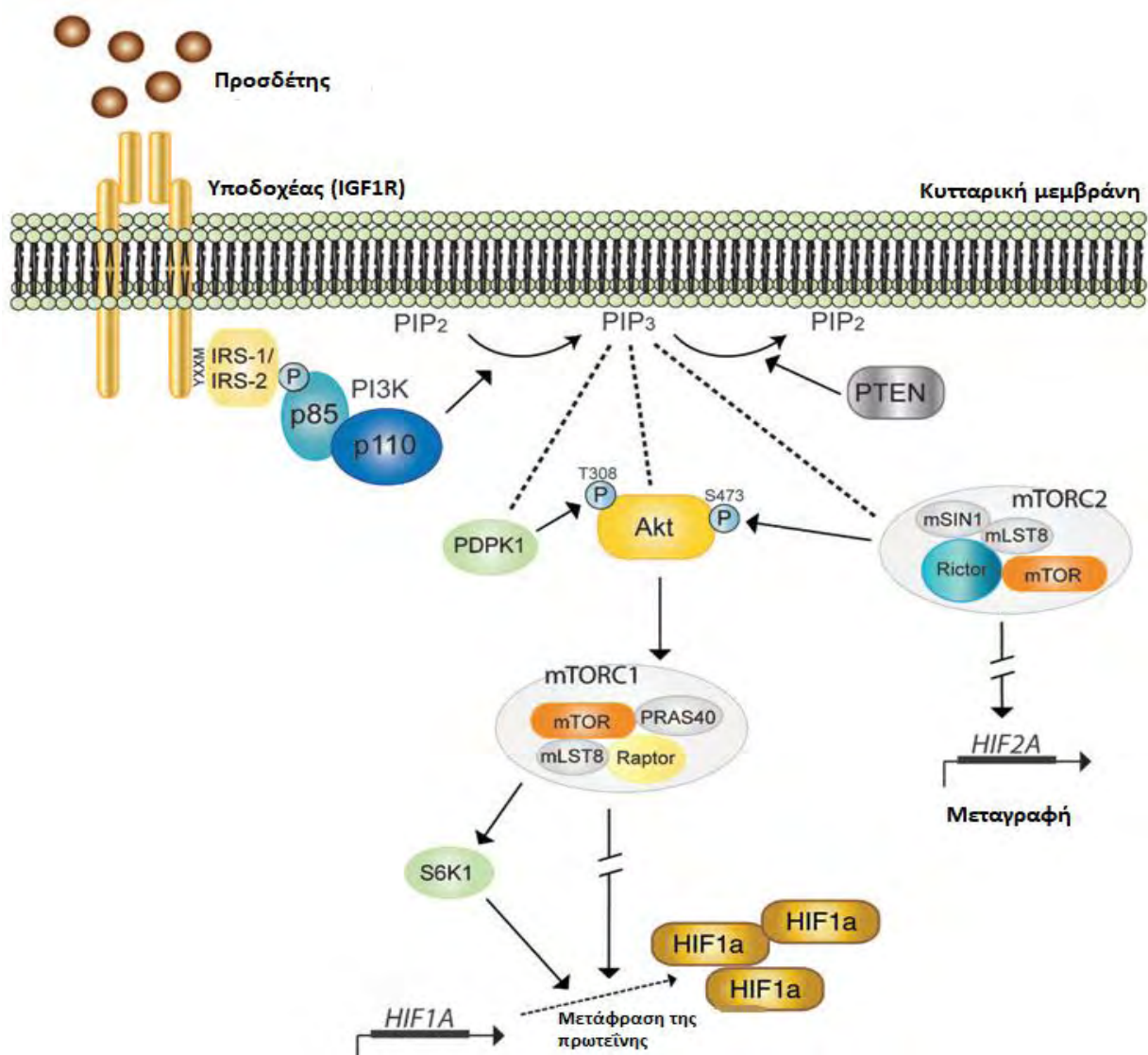


**Εικόνα 5: Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ HIF-2α και EGFR.** Ο HIF-2α μπορεί να επάγει τον EGFR, ο οποίος συμμετέχει στην αντίσταση στα αντι-οιστρογόνα. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ο EGFR επάγει την έκφραση του HIF-2α. Έτσι, EGFR και HIF-2α υπάρχουν με θετική ανατροφοδότηση για να επάγουν την αντίσταση στα αντι-οιστρογόνα (30)

### 1.7.2 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού PI3K/AKT/mTOR, έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του HIF μέσω της ενεργοποίησης του στόχου της ραπαμικίνης στα θηλαστικά (mammalian target of rapamycin, mTOR) (31). Υπάρχουν δύο διακριτά σύμπλοκα mTOR, το mTORC1, που είναι ευαίσθητο στην αναστολή από τη ραπαμικίνη και ενεργοποιείται από την AKT επάγοντας την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης της p70 S6 κινάσης και της 4E-BP1 και το mTORC2, το οποίο δεν αναστέλλεται από την ραπαμικίνη και ενεργοποιεί την AKT μέσω φωσφορυλίωσης (32).

Η βιβλιογραφία περιγράφει ότι η έκφραση του HIF-2α εξαρτάται από το mTORC2, ενώ η έκφραση του HIF-1α εξαρτάται και από τα δύο σύμπλοκα. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η έκφραση του HIF-2α εξαρτάται από την ισομορφή AKT2 ενώ η έκφραση του HIF-1α από την ισομορφή AKT3 (33). Μια επόμενη μελέτη, επιβεβαίωσε την εξάρτηση του HIF-2α από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-mTORC2, το οποίο φαίνεται επίσης να ελέγχει τη μεταγραφή του HIF-2α και να καθορίζει το βαθμό αγγείωσης σε όγκους νευροβλαστώματος (Εικόνα 6) (12).



**Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της διαφορετικής ρύθμισης του HIF1 και του HIF2.** Η ρύθμιση του HIF-2α εξαρτάται από την σηματοδότηση του IGF1R υποδοχέα και τη δράση της PI3K και του mTORC2. Η δράση του mTORC2 πιθανόν ρυθμίζεται άμεσα από την παραγωγή της PIP<sub>3</sub> στην κυτταρική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-1α ρυθμίζεται κλασσικά από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt-mTORC1. IGF1R: υποδοχέας του insulin-like αυξητικού παράγοντα, PIP<sub>3</sub>: 3-φωσφορική ινοσιτόλη, PI3K:κινάση της 3-φωσφορικής ινοσιτίδης. Akt: πρωτεϊνική κινάση B. (12)

### 1.7.3 Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σταθερότητας

Οι μοριακοί μηχανισμοί που περιγράφουν την ρύθμιση της πρωτεϊνικής σταθερότητας του HIF-2α είναι ελάχιστα. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, η σταθερότητα του HIF-2α ελέγχεται από μια επικρατή ισομορφή της PI3K στα μακροφάγα μέσω της σηματοδοτικής οδού PTEN/PI3K/AKT (34). Πιο ειδικά, σε ποντίκια όπου έγινε απαλοιφή του γονιδίου *PTEN* και η οδός PI3K/AKT είναι ενεργοποιημένη, παρατηρήθηκε αναστολή της αποικοδόμησης του HIF-2α από το πρωτεάσωμα, ενώ όταν η οδός PI3K/AKT αναστέλλεται, ο HIF-2α αποδομείται σε συνθήκες υποξίας.



#### **1.7.4 Ρύθμιση από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις**

Ο HIF-2α υπόκειται σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις ανεξάρτητου του οξυγόνου, οι οποίες ρυθμίζουν την πρωτεϊνική του σταθερότητα, τη μεταγραφική του ενεργότητα και την αλληλεπίδρασή του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

##### **1.7.4.1 Ακετυλίωση**

Η ακετυλίωση αποτελεί μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών κατά την οποία μια ακετυλομάδα προστίθεται σε κατάλοιπα λυσίνης (K) μέσω των ακυλοτρανφερασών. Ο HIF-2α ρυθμίζεται από μια οικογένεια απακετυλασών, ευαίσθητων στο οξειδοαναγωγικό στρες και εξαρτώμενων από το NAD<sup>+</sup>, που ονομάζονται σιρτουίνες. Έχει αναφερθεί ότι ο HIF-2α ακετυλιώνεται σε κατάλοιπα λυσίνης από τον παράγοντα CBP και αποακετυλιώνεται από την SIRT1 στα κατάλοιπα λυσίνης Lys-385, Lys-685 και Lys-741, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της πρόσδεσης του HIF-2α στον υποκινητή της EPO και της δράσης του *in vitro* σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Hep3B.(35).

##### **1.7.4.2 Σουμοϋλίωση**

Η SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) είναι ένα μικρό σφαιρικό πολυπεπτίδιο που μοιάζει με την ουβικιτίνη στη δομή και προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους με παρόμοιο ενζυμικό μηχανισμό. Η σουμοϋλίωση είναι μια διαδικασία με την οποία οι πρωτεΐνες δεν οδηγούνται απαραίτητα για αποικοδόμηση αλλά έχει συνδεθεί και με μονοπάτια όπως η ενδοκυτταρική μεταφορά, ο κυτταρικός κύκλος, η DNA αντιγραφή και επιδιόρθωση, ο RNA μεταβολισμός και η κυτταρική σηματοδότηση (36).

Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α είναι πρωτεΐνη στόχος για σουμοϋλίωση και περιέχει δύο αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης. Πειράματα με μεταλλάξεις έδειξαν ότι η SUMO-2 πρωτεΐνη συνδέεται στην λυσίνη 394 του HIF-2α με αποτέλεσμα την μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας λόγω αλληλεπίδρασής του με τις πρωτεΐνες RNF4 λιγάση, SENP1 πρωτεάση και τον VHL και αποικοδόμησής του στο πρωτεάσωμα (37).

##### **1.7.4.3 Φωσφορυλίωση**

Η φωσφορυλίωση είναι μια μετά-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών κατά την οποία μια φωσφορική ομάδα προστίθεται σε κατάλοιπα θρεονίνης, σερίνης ή τυροσίνης από ένζυμα που ονομάζονται κινάσες. Η διαδικασία απομάκρυνσης της φωσφορικής ομάδας λέγεται αποφωσφορυλίωση και πραγματοποιείται από μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται φωσφατάσες.

Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2 α φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο θρεονίνης Thr-324 από την κινάση της πρωτεΐνης D1 (PRKD1) με αποτέλεσμα την αναστολή της αλληλεπίδρασής του με τον μεταγραφικό παράγοντα SP1 (Specificity Protein 1) και την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα νιμπρίνη (NSBS1) που είναι απαραίτητος για την επιδιόρθωση του DNA (38).

Επίσης, ο HIF-2 α φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης 2 στο συντηρημένο

κατάλοιπο θρεονίνης Thr-844 της επικράτειας C-TAD το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας **(41)**, λόγω της μείωσης της αλληλεπίδρασης με τον FIH **(39)**. Τέλος, πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την κινάση της καζεΐνης CK1δ σε δύο διακριτές θέσεις, στη σερίνη Ser-383 και στη θρεονίνη Thr-528. Η φωσφορυλίωση αυτή, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ερυθροποιητίνης, εμποδίζοντας την εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 έξοδο του HIF-2α στο κυτταρόπλασμα **(40)**.

#### **1.7.4.4 Η οικογένεια των κινασών που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK)**

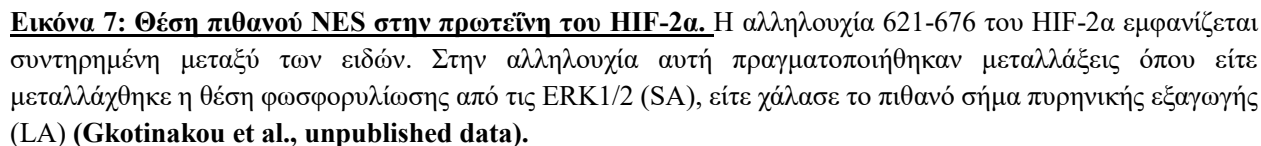
Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ελέγχονται από εξωκυττάρια μηνύματα (ERK) είναι υψηλά διατηρημένες κινάσες σερίνης/θρεονίνης και ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAP κινάσες). Η οικογένεια ERK των MAP κινασών αποτελείται από τις κινάσες ERK1 και ERK2, οι οποίες είναι όμοιες δομικά και λειτουργικά, και την MAP κινάση ERK3, η οποία παρουσιάζει σημαντική ομολογία με την ERK2 ωστόσο φέρει διακριτές λειτουργικές διαφορές. Τα μέλη της οικογένειας των ERK που εκφράζονται ευρέως είναι οι κινάσες ERK1 και ERK2 (p42/44 MAP κινάσες). Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης σε αλληλουχία Ser/Thr-Pro **(42)**

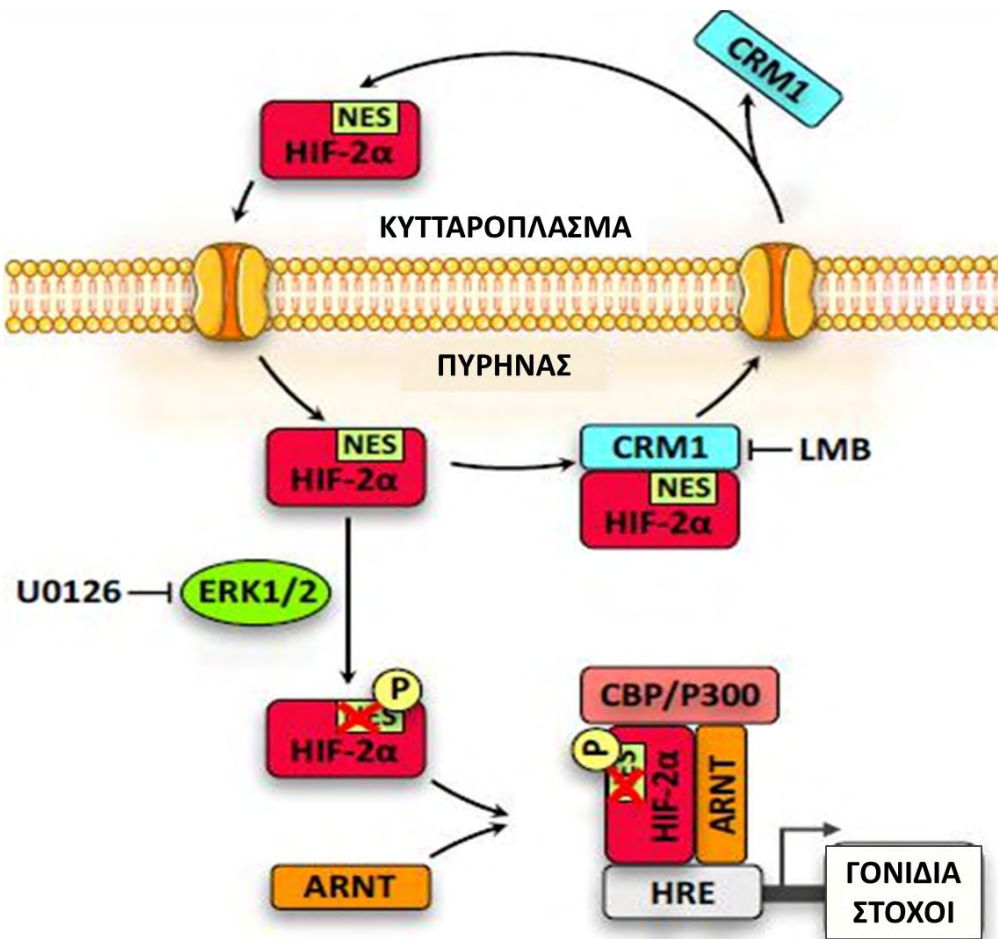
Η ενεργοποίηση των MAP κινασών εξαρτάται από έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων. Ειδικότερα, η φωσφορυλίωση των διαφόρων MAP κινασών πραγματοποιείται από μια κατηγορία κινασών που καλούνται MAPK κινάσες (MAPKKs ή MEKs). Οι ERK κινάσες φωσφορυλιώνονται από τις MEK1 και MEK2 κινάσες στην αλληλουχία Thr-Glu-Tyr. Το μονοπάτι των ERK ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες και συμμετέχει στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης **(42)**.

Το εργαστήριό μας έδειξε ότι οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν το πρώτο μέλος της οικογένειας των HIF, HIF-1α στις Ser641 και Ser643 **(43)**. Η φωσφορυλίωση των ERK1/2 στα κατάλοιπα Ser641 και Ser643 επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή του HIF-1α καθώς με αναστολή αυτής ο HIF-1α γίνεται πιο κυτταροπλασματικός, λόγω αναστολής της αλληλεπίδρασης του HIF-1α με την εξπορτίνη 1 (CRM1) **(44)**.

Ωστόσο, δεδομένα για την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τις ERK1/2 δεν είναι γνωστά. Πρόσφατα δημοσιεύτα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας υποδεικνύουν ότι ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται στην θέση Ser672 από τις ERK1/2. Συγκεκριμένα, αναστολή της φωσφορυλίωσης με χρήση του αναστολέα της ενεργοποίησης του μονοπατιού των ERK1/2, U0126, οδήγησε σε έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα και μείωση της μεταγραφικής του ενεργότητας **(Gkotinakou et al., unpublished data)**.

Η μελέτη του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τις ERK1/2 έδειξε την ύπαρξη μίας αλληλουχίας πλούσιας σε λευκίνες (Leu), η οποία είναι διατηρημένη μεταξύ των οργανισμών και φέρει το μοτίβο της προτεινόμενης υδροφοβικής αλληλουχίας για το σήμα εξόδου από τον

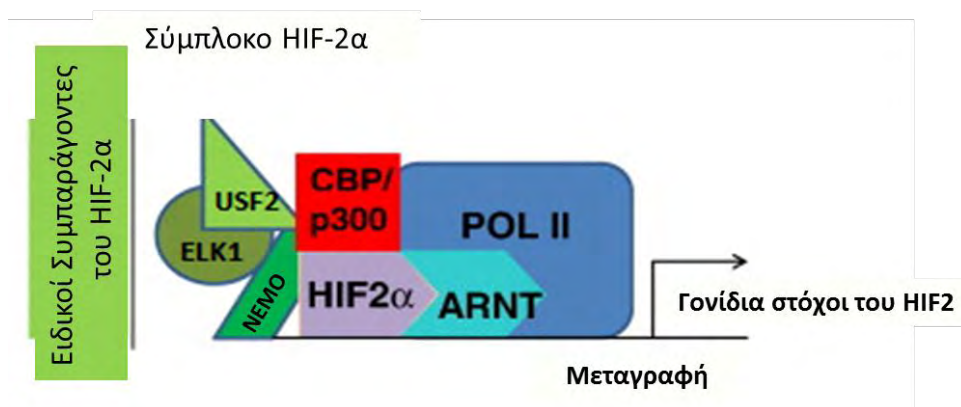




**Εικόνα 8: Προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης του HIF-2α από τις ERK1/2.** Όταν ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, ένα πιθανό σήμα πυρηνικής εξαγωγής κρύβεται, αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση με την εξαπορτίνη 1, CRM1, και την έξοδο του από τον πυρήνα. Έτσι, ετεροδιμερίζεται με τον ARNT, προσδένεται στα HRE και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Αναστολή της φωσφορυλίωσης με τη χρήση του αναστολέα της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK1/2, U0126, οδήγησε σε αλληλεπίδραση με την και αυξημένη έξοδο του HIF-2<sup>α</sup> από τον πυρήνα (Gkoutinakou et al., unpublished data).

### 1.7.5 Ρύθμιση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες.

Ο HIF-2α, συνεργάζεται με πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων, ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές στοχεύουν στην ρύθμισή του σε επίπεδο σταθερότητας και δράσης, στην εξειδίκευσή του ως προς τα γονίδια στόχους και στη διαφοροποίησή του από τον HIF-1α (Εικόνα 8).



**Εικόνα 9: Το μεταγραφικό σύμπλοκο του HIF-2α.** Ο HIF-2α πετυχαίνει την εξειδίκευσή του ως προς τα γονίδια στόχους μέσω αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς συμπαράγοντες όπως οι USF2, ELK1 και NEMO πάνω στους υποκινητές των γονιδίων του (45)

#### 1.7.5.1 ELK-1

Ο ELK-1 είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS-1, οι οποίοι συμμετέχουν στον έλεγχο κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η μετάσταση. Έχει αναφερθεί πως η δράση του αυξάνει μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση MAPK ως απόκριση στην υποξία (46). Έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ HIF-2α και ELK-1 είναι απαραίτητη για την βέλτιστη επαγωγή σε υποξικές συνθήκες, γονιδίων-στόχων του HIF-2 που φέρουν στον υποκινητή τους κοντά στα HREs στοιχεία πρόσδεσης για τον ELK-1 (47). Ωστόσο καθώς η αλληλεπίδραση δεν είχε καμία επίδραση στην επαγωγή της έκφρασης μιας άλλης ομάδας γονιδίων-στόχων του HIF-2 (*NDRG-1*, *IGFBP-1*, *ADM*), προτείνεται ότι ο ELK-1 δε δρα ως γενικός ενεργοποιητής των γονιδίων του HIF-2, αλλά η δράση του εξαρτάται από την αλληλουχία του υποκινητή (48).

#### 1.7.5.2 NEMO

Ο ειδικός ρυθμιστής του NF-κB (NEMO) έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με την επικράτεια C-TAD του HIF-2α και να προωθεί την προσάραξη του συνενεργοποιητή p300 σε αυτή, ενισχύοντας τη μεταγραφική δράση του HIF-2. Η ιδιαιτερότητα της αλληλεπίδρασης αυτής βρίσκεται στο γεγονός ότι οδηγεί σε ενεργοποίηση του HIF-2 σε συνθήκες νορμοξίας (49).

#### 1.7.5.3 USF2

Ο Upstream Stimulatory Factor (USF2) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται ευρέως και δρα ως διμερές. Η παρουσία του στο μεταγραφικό σύμπλοκο του HIF-2 είναι καθοριστικής σημασίας για την επαγωγή γονιδίων-στόχων του HIF-2 σε υποξία, καθώς ο USF2 στρατολογεί τους CBP και p300 πάνω στους υποκινητές των γονιδίων αυτών (50).

#### 1.7.5.4 c-MYC

Τα MYC (myelocytomatosis oncogene) είναι μια οικογένεια ρυθμιστικών γονιδίων και πρωτοογκογονιδίων που κωδικεύουν για μεταγραφικούς παράγοντες. Αποτελούνται από τρία γονίδια το

c-myc, το I-myc και το n-myc. Το c-myc εκφράζεται συχνά στους καρκίνους και οδηγεί στην αυξημένη έκφραση γονιδίων και έτσι στην προαγωγή του καρκίνου (51). Ελέγχει τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, σχηματίζοντας ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη MAX και επάγοντας την έκφραση γονιδίων όπως η κυκλίνη D2 (*CCND2*) και ο *E2F1*. Καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 και p27 (52).

Ο HIF-2α σε υποξία σχηματίζει σύμπλοκο με το MYC, προκαλώντας τη σταθεροποίηση των συμπλόκων MYC-MAX και MYC-MAX-SP1, την αυξημένη πρόσδεση στους υποκινητές των γονιδίων *E2F1*, *p21*, *p27* και *CCND2*, οδηγώντας σε ταχύτατη είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (53) (Εικόνα 10)



**Εικόνα 10: Επίδραση του HIF-2α στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του συμπλέγματος του MYC.** Τα κύτταρα που εκφράζουν HIF-2α εμφανίζουν αυξημένο σχηματισμό του συμπλόκου του MYC και την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων, ωστόσο ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός (53)

## 1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-2 ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

### 1.8.1 Φλεγμονή

Στο περιβάλλον εκτεταμένης φλεγμονής όπως για παράδειγμα στις ρευματικές παθήσεις, στις αθηροσκληρωτικές πλάκες και στους συμπαγείς όγκους, αναπτύσσονται συχνά υποξικές συνθήκες λόγω της ανισορροπίας ανάμεσα στις αυξημένες ιστικές απαιτήσεις για οξυγόνο και στη ταυτόχρονη μειωμένη παροχή του. Οι HIF επάγονται από την υποξία, αλλά υποστηρίζεται ότι επάγονται και από ένα μεγάλο αριθμό μεσολαβητών της φλεγμονής, και κατ'επέκταση η ενεργοποίηση των παραγόντων HIF στο περιβάλλον αυτό θεωρείται ο συνδετικός κρίκος μεταξύ υποξίας και χρόνιας φλεγμονής (54)

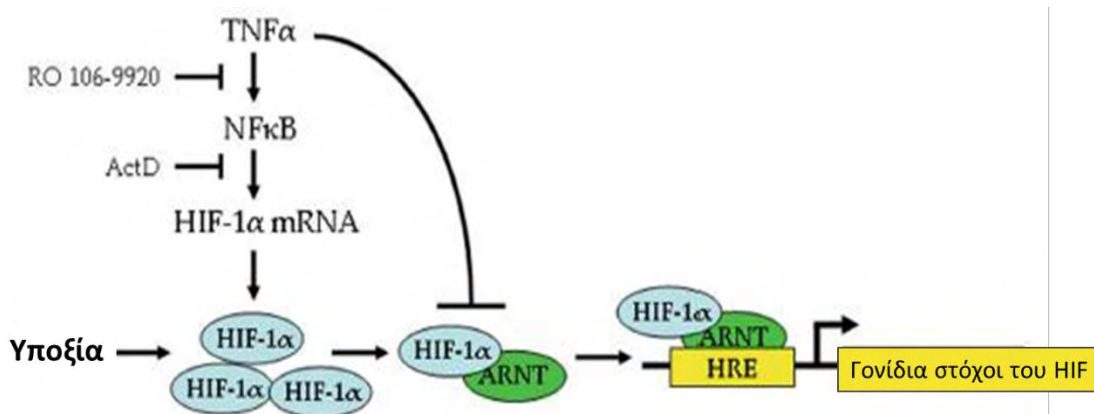
Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την εμπλοκή του HIF-2α στη φλεγμονή έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου έχει αρχίσει να διαφαίνεται ο σημαντικός του ρόλος στον έλεγχο της ανοσοαπάντησης (55). Ως απόκριση στην υποξία ο HIF-2α εκφράζεται σε μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor Associated Macrophages, TAMs) και σε T κύτταρα CD8+, όπου η έκφρασή του επηρεάζεται από την παρουσία κυτταροκινών (56).

Ο ρόλος του HIF-2α έχει επίσης μελετηθεί στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), ένα αυτοάνοσο



νόσημα που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή του αρθρικού υμένα, προοδευτική καταστροφή του χόνδρου των αρθρώσεων και τελικά διάβρωση των οστών (57). Έχει βρεθεί ότι ο HIF-2α αποτελεί ρυθμιστή της παθογένεσης της RA, με το να ελέγχει λειτουργίες κυττάρων ομοίων με ινοβλάστες του αρθρικού θύλακα (fibroblast-like synoviocytes, FLS) οι οποίες σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου. Συγκεκριμένα ο HIF-2α υπερεκφράζεται στα FLS, ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό τους και επάγει σε αυτά την έκφραση της IL-6 και του TNF-α (57).

Ωστόσο, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το εάν και σε ποιο επίπεδο ο HIF-2α ρυθμίζει και ρυθμίζεται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ελάχιστα, ενώ αντίθετα, υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τη ρύθμιση της ισομορφής HIF-1α. Μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η έκθεση μυοκυττάρων στον TNF-α είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του HIF-1α μέσω αύξησης της μεταγραφής του και η αύξηση αυτή μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κΒ. Ωστόσο, ο TNF-α είχε αρνητική επίδραση στη μεταγραφική δράση του HIF-1α, αναστέλλοντας τον διμερισμό με τον ARNT και την ακόλουθη πρόσδεση στα HREs και τελικά τη μεταγραφή των γονιδίων του (58) (Εικόνα 11). Όσον αφορά τη ρύθμιση του HIF-2α από παράγοντες φλεγμονής, πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι σε συνθήκες νορμοξίας και ταυτόχρονης αναστολής των PHDs η IL-1β αυξάνει την έκφραση του HIF-2α και τον εντοπισμό του στους αναπτυσσόμενους κροσσούς χονδροκυττάρων, επηρεάζοντας αρνητικά τη μεταγραφική του δράση (59).

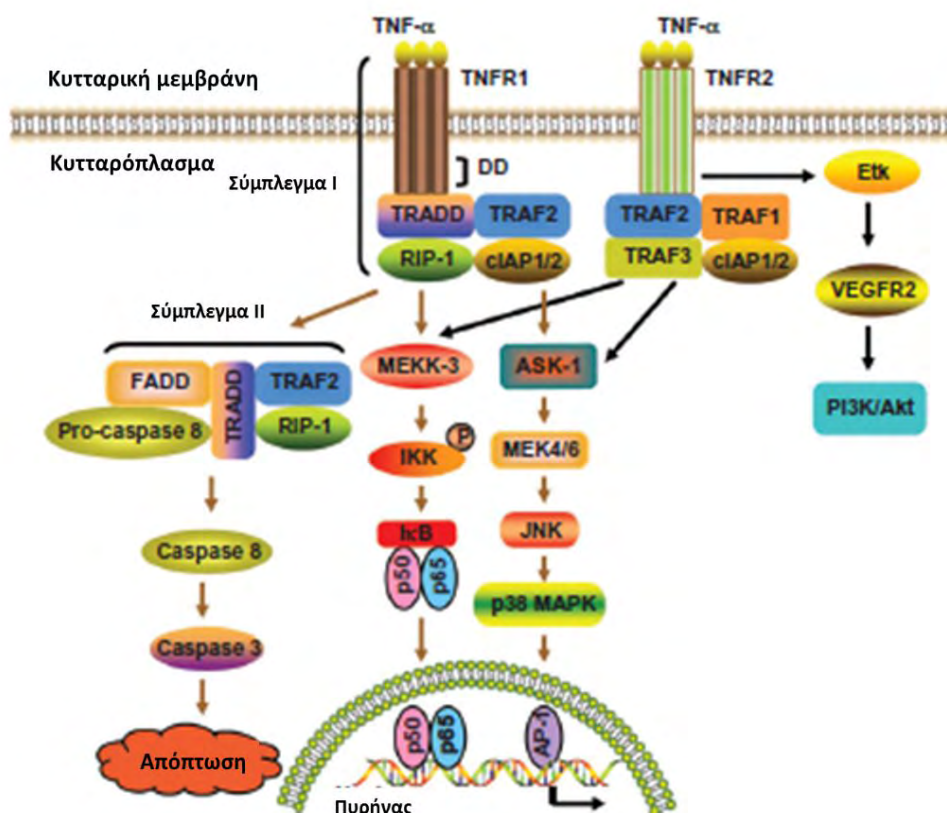


**Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του TNF-α στην έκφραση και την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α.** Ο TNF-α επάγει το mRNA του HIF-1α και την έκφραση της πρωτεΐνης μέσω του μονοπατιού του NF-κΒ, αλλά αναστέλλει τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς του HIF-1α με τον ARNT, την πρόσδεση στο DNA και τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του HIF-1 (58)

### 1.8.2 Ο TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha)

Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α) είναι μια κυτταροκίνη που συμμετέχει στην οξεία φάση της φλεγμονής. Παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα αλλά και από άλλους κυτταρικούς τύπους όπως ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα. Ο TNF-α παράγεται αρχικά ως μια

βιολογικά δραστική μεμβρανική πρόδρομη πρωτεΐνη 26kDa, η οποία ακολούθως διασπάται, κυρίως από το TNF-α μετατρεπτικό ένζυμο για να απελευθερώσει την ελεύθερη πρωτεΐνη 17kDa. Η πρωτεΐνη σχηματίζει βιολογικά ενεργά ομοτριμερή που δρουν σε δύο τύπους υποδοχέων, τους TNFR1 και TNFR2. Η πρόσδεση στον TNFR1 ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό των AP1, MAPK και NF-κB και στη διέγερση φλεγμονώδους απόκρισης καθώς και στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού των κασπασών και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, ενώ η πρόσδεση στον TNFR2 ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό του NF-κB (60),(61) (Εικόνα 11).



**Εικόνα 12: Σηματοδοτικό μονοπάτι του TNF-α.** Η πρόσδεση του TNF-α στον TNFR1 ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό των AP1, MAPK και NF-κB και στη διέγερση φλεγμονώδους απόκρισης καθώς και στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού των κασπασών και οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, ενώ η πρόσδεση στον TNFR2 ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό του NF-κB και της PI3K/Akt. (62)

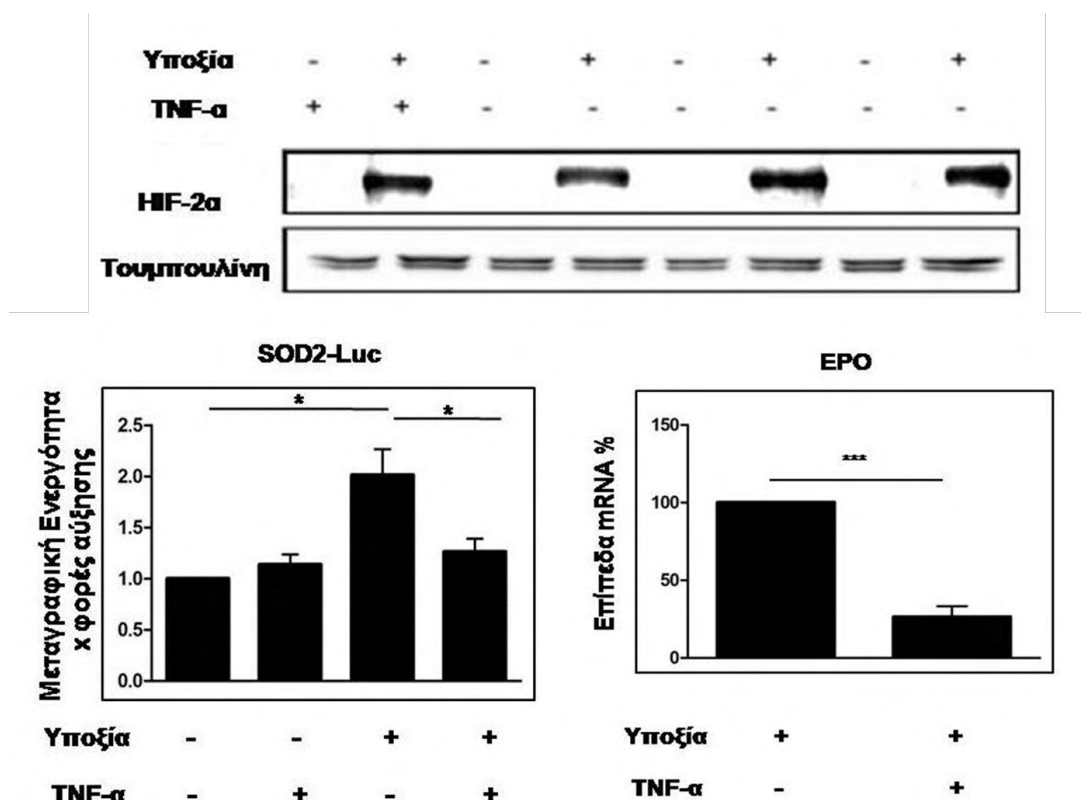
Όσον αφορά τον καρκίνο, ο TNF-α έχει διφορούμενο ρόλο. Απ' την μια πλευρά, ο TNF-α μπορεί να δρα ως ενδογενής εκκινητής του όγκου, καθώς διεγείρει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την αγγειογένεση του όγκου. Από την άλλη πλευρά, ο TNF-α μπορεί να δρα ως 'δολοφόνος' του καρκίνου. Η ιδιότητα του TNF-α να προκαλεί θάνατο στα καρκινικά κύτταρα τον καθιστά πιθανό αντικαρκινικό (63). Πολλές αναφορές έδειξαν ότι η συγκέντρωση του TNF-α στον ορό είναι αυξημένη σε ασθενείς με καρκίνο, καθώς και ότι η έκφρασή του είναι υψηλότερη σε διάφορους προ-νεοπλαστικούς και καρκινικούς ιστούς (64). Αφού, στο μικροπεριβάλλον του όγκου αναπτύσσονται συχνά και συνθήκες υποξίας, διαφαίνεται



μια αλληλεπίδραση μεταξύ του TNF-α και της υποξίας.

Αρκετά είναι τα βιβλιογραφικά δεδομένα μεταξύ της αλληλεπίδρασης του TNF-α με την ισομορφή HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την θετική ρύθμιση του HIF-1α από τον TNF-α με την συμμετοχή του μονοπατιού του NF-κΒ σε μελέτες σε ανθρώπινους όγκους γλοιοβλαστώματος (65), ποντίκια με καρκίνο του πνεύμονα (66) αλλά και σε πρωτογενή σκελετικά μυϊκά κύτταρα ποντικών (67). Ωστόσο υπάρχουν και ερευνητικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο HIF-1α υπόκειται σε αρνητική ρύθμιση από τον TNF-α. Από μελέτη σε κύτταρα PC12 φαιοχρωμοκυττώματος ποντικού έχει βρεθεί ότι ο TNF-α καταστέλλει τη δράση του HIF-1 ενεργοποιώντας την εξαρτώμενη από τον NF-κΒ έκφραση της πρωτεΐνης της ανασταλτικής επικράτειας PAS (IPAS) (68). Τέλος, πρόσφατα δείχθηκε ότι ο TNF-α αναστέλλει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT και την πρόσδεση στο DNA σε λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών σε υποξία (58).

Δεδομένα ωστόσο για την επίδραση του TNF-α στον HIF-2α δεν είναι γνωστά. Ορισμένα αδημοσίευστα αποτελέσματα της ομάδας μας έδειξαν ότι η έκθεση κυττάρων ηπατοκαρκινώματος στον TNF-α δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α ωστόσο μείωσε σημαντικά τη μεταγραφική του δράση (Εικόνα 12).



**Εικόνα 13: Επίδραση του TNF-α στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α και στην μεταγραφική του ενεργότητα.** Κύτταρα ηπατοκαρκινώματος επώαστηκαν με TNF-α (10ng/ml) και αναλύθηκαν με SDS-PAGE για την μελέτη της επίδρασης στα πρωτεϊνικά επίπεδα. Επίσης, με RT-PCR και λουσιφεράση μετρήθηκε η επίδραση του TNF-α στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α (Διδακτορική διατριβή Ευανθίας Πάγγου., 2016)

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α.

Πρώτος στόχος είναι η μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης του HIF-2α από τον προφλεγμονώδη παράγοντα TNF-α στην υποξία. Πιο συγκεκριμένα θα διερευνηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α, η μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του καθώς και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του. Τέλος, θα αναζητηθεί και πιθανός μοριακός μηχανισμός δράσης του TNF-α στον HIF-2α.

Δεύτερος στόχος της εργασίας είναι η διερεύνηση της λειτουργίας πιθανού σήματος πυρηνικού εξόδου (NES) του HIF-2α κοντά στη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Πιο συγκεκριμένα θα κλωνοποιηθεί το τμήμα 640-679 του HIF-2α καθώς και των μεταλλαγμάτων του και θα ελεγχθεί η λειτουργία του.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΥΛΙΚΑ

##### 3.1.1 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές Huh7 (ηπατοκαρκίνωμα) και HeLa sp (καρκίνος του τραχήλου).

##### 3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Τα μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα βακτήρια E.Coli TOP10 τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και ενδείκνυται για μετασχηματισμό με εξωγενές DNA.

##### 3.1.3 Μέσα κυτταροκαλλιέργειας

Από τις εταιρείες BIOSERA και AppliChem χρησιμοποιήθηκαν:

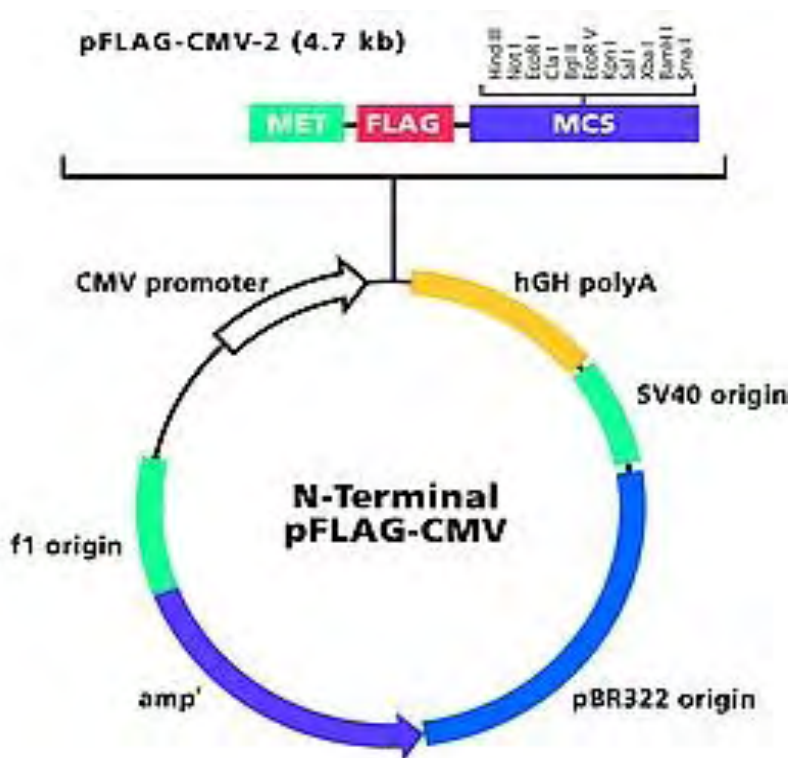
- **Θρεπτικό υλικό DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium-high glucose*).** Διαθέτει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, πυροσταφυλικό νάτριο και L-γλουταμίνη. Ενδείκνυται για την καλλιέργεια των περισσότερων καρκινικών κυτταρικών σειρών.
- **Βόειος εμβρυϊκός ορός (10% v/v FBS).** Παρέχει στα καλλιεργούμενα κύτταρα τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες που απαιτούνται για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους.
- **Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (1000U/l).** Το αντιβιοτικό σχήμα (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) συνεισφέρει αποτελεσματικά στην προστασία των κυτταρικών σειρών από επιμόλυνση εξωγενών μικροβιακών παραγόντων.
- **Διάλυμα τρυψίνης EDTA 1x σε PBS.** Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυ-τελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από το στερεό υπόστρωμα του τρυβλίου καλλιέργειας όπου και αναπτύσσονται, αλλά και από την μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

##### 3.1.4 Πλασμιδιακοί φορείς

- ✓ pFLAG -CMV<sup>TM</sup>-2 (Sigma)

Πλασμιδιακός φορέας που φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV, δίνοντας την δυνατότητα να υπερεκφραστούν κλωνοποιημένες πρωτεΐνες σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Περιέχει μια αλληλουχία 8 αμινοξέων που κωδικοποιεί τον επίτοπο FLAG και φέρει γονίδιο

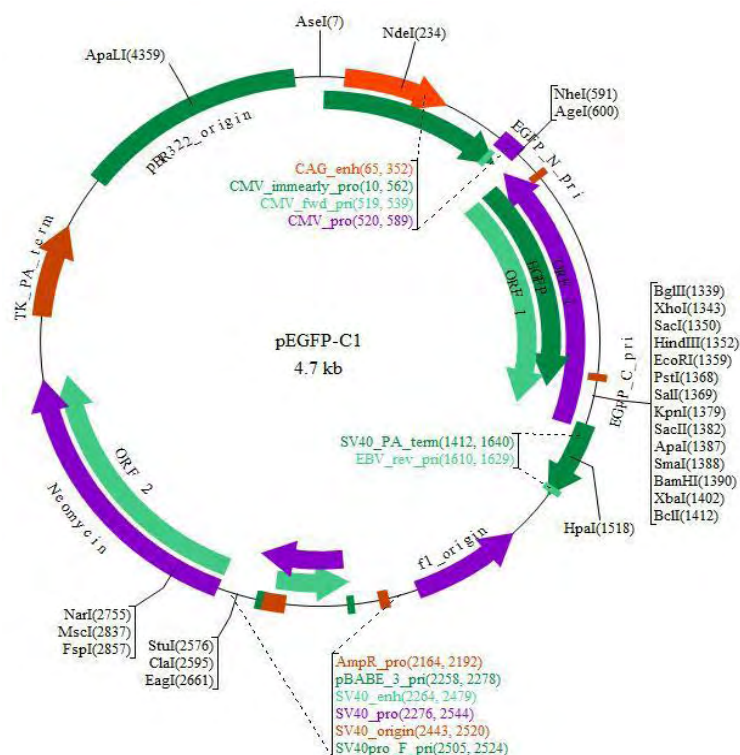
ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκε το cDNA του HIF-2α πλήρους μήκους (WT)



**Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pFLAG-CMV<sup>TM</sup>-2**

✓ pEGFP-C1 (Clontech)

Περιέχει μια αλληλουχία αμινοξέων που κωδικοποιεί τον επίτοπο GFP και φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη. Στον φορέα αυτό κλωνοποιήθηκαν τα cDNA των μικρότερων τμημάτων των διαφόρων μορφών του HIF-2α (WT 640-679, S672A 640-679, L662/667A 640-679, S672A/L662/679A 640-679)



**Εικόνα 15: Σηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-C1**

### 3.1.5 Εκκινητές

Οι εκκινητές και τα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν από την εταιρεία VBC-Biotech.

✓ Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για Real Time PCR:

**EPO F:** 5'- AGG CCG AGA ATA TCA GAC G -3'

**EPO R:** 5'- CCA TCC TCT TCC AGG CAT AGA AA- 3'

**PAI-1 F:** 5'- CAG CTG ACA GGA GA -3'

**PAI-1 R:** 5'- CCC ATG AGC TCC TTG TAC AGA T -3'

Το τμήμα cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία **640-679** του HIF-2α ενισχύθηκε με χρήση των εκκινητών:

**HIF2 R- 679** 5'- TTTTGGATCCTCAGAAGGTGGAGAC -3'

**HIF2 F- 640** 5'- TTTTGGATCCATGCCAGATCCACCATTACAT-3

- ✓ Το τμήμα cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία **640-679** του HIF-2α ελέγχθηκε με χρήση των εκκινητών:

**HIF2 R- 679** 5'- TTTTGGATCCTCAGAAGGTGGAGAC -3'

**pEGFP F-1299** 5'-GAT CAC TCT CGG CAT GGA C -3'

### 3.1.6 Χημικές ενώσεις-Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma (USA) και AppliChem (USA).

### 3.1.7 Υλικά Μοριακής Βιολογίας

Τα υλικά μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών New England BioLabs Inc., Takara και Fermentas.

### 3.1.8 Αντισώματα

- ✓ Πολυκλωνικό αντί-HIF2α αντίσωμα (Novus Biologicals) σε αραίωση 1:600
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-ARNT αντίσωμα (BD Biosciences) σε αραίωση 1:500
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-actin αντίσωμα (Cell Signaling) σε αραίωση 1:5000
- ✓ Μονοκλωνικό αντί-tubulin αντίσωμα (Cell Signaling) σε αραίωση 1:10000
- ✓ Πολυκλωνικό αντί-CRM1 αντίσωμα (Millipore) σε αραίωση 1:1000
- ✓ Αντί-ορός κουνελιού GFP σε αραίωση 1:500
- ✓ Συζευγμένα με υπεροξειδάση (για ανοσοαποτύπωση) (Santa Cruz) ή με Cy3 (για ανοσοφθορισμό) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) αντισώματα έναντι της IgG από κουνέλι ή ποντικό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερα αντισώματα.

### 3.1.9 Ένζυμα

Για εφαρμογές πέψης πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εξής περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

- ✓ BamHI-HF(R0136S) (20.000 U/ml) (New England Biolabs)
- ✓ XhoI-HF(R0146S) (20.000 U/ml) (New England Biolabs)
- ✓ BglII-HF(1020B) (5.000 U/ml) (Takara)

Για τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Vent (2000 U/ml) και η πολυμεράση Taq (5 U/μl).

Για την αντίδραση λιγάσης (ligation reactions) χρησιμοποιήθηκε η DNA λιγάση T4 (400.000 U/ml), καθώς και η αλκαλική φωσφατάση CIP (Calfintestinal alkaline phosphatase, 10.000 U/ml).

### **3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες**

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) το οποίο περιείχε 10% ορό εμβρύου βωός (FBS) και 100U/ml των αντιβιοτικών πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο στους 37° C σε 5% CO<sub>2</sub>.

#### **3.2.2 Επίδραση ουσιών και μελέτη της επαγωγής του HIF-2α**

Η επαγωγή του HIF-2α στις κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με επώαση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (1% O<sub>2</sub>), οι οποίες αναπτύσσονται σε ειδικό θάλαμο υποξίας IN VIVO<sub>2</sub> (Baker Ruskin). Για την περαιτέρω μελέτη της επαγωγής του HIF, τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας υπό την επίδραση του παράγοντα φλεγμονής TNF-α.

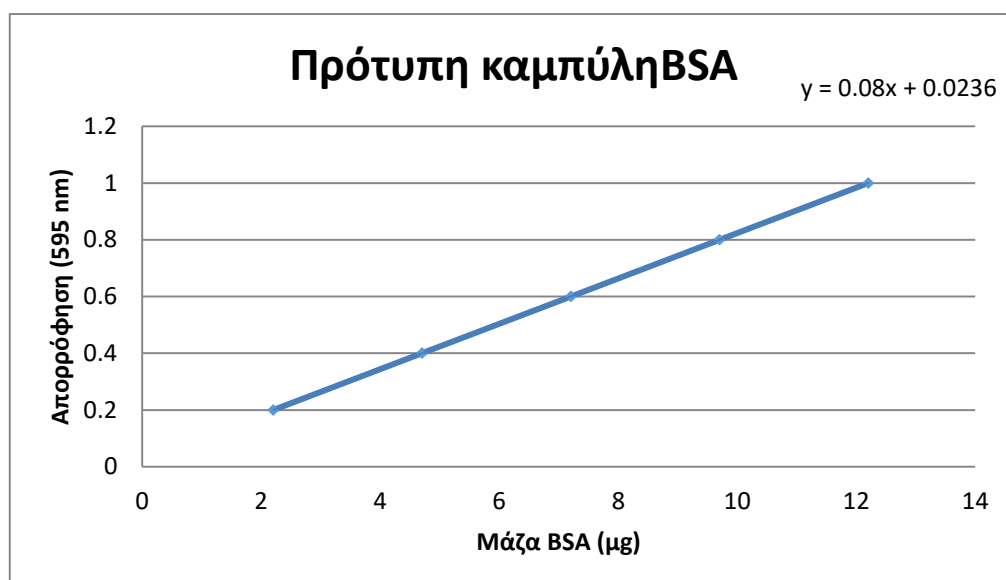
#### **3.2.3 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος**

Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS 1X και αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με τη χρήση διαλύματος λύσης (25mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1M DTT, 100mM PMSF). Το DTT χρησιμοποιείτε ως αναγωγικό δισουλφιδικών δεσμών και το PMSF είναι αναστολέας πρωτεασών Ser και προστίθενται στο διάλυμα λύσης ακριβώς πριν την χρήση. Τα λύματα φέρονται σε σωληνάκι των 1,5 ml, επωάζονται 20 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρώνονται στα 12000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που αποτελεί και το πρωτεϊνικό δείγμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και πριν την ανάλυση με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, προστίθεται 1mM DTT και διάλυμα Laemmle (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 0.05% Bromophenol Blue, 25mM DTT), θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά και φύλαξη στους -20°C.

#### **3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.**

Η μέθοδος Bradford βασίζεται σε συγκεκριμένες ιδιότητες της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250. Ουσιαστικά, βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της εν λόγω χρωστικής από κόκκινο – καφέ σε μπλε κατά τη σύνδεσή της σε πρωτεΐνες, υπό όξινες συνθήκες. Η κόκκινη μορφή του αντιδραστηρίου Bradford δίνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια της στις ιονισμένες ομάδες της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης και να εκθέτει τις υδρόφοβες

περιοχές. Αυτές οι υδρόφοβες περιοχές φτιάχνουν δεσμούς van der Waals με τις μη πολικές περιοχές της χρωστικής σταθεροποιώντας τη μπλε μορφή της. Η χρωστική αυτή κάτω από όξινες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών σχηματίζει με αυτές ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 595 nm. Το διάλυμα Bradford που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Bio-Rad. Από το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιούνται 200 μl αραιωμένα με νερό σε τελικό όγκο 1 ml είτε σαν τυφλό, είτε με προσθήκη 5 μl διαλύματος πρωτεϊνών, για φωτομέτρηση στα 595 nm, όπου το σύμπλοκο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση. Ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής παραμένει σταθερός για μεγάλο εύρος συγκέντρωσης και έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης μας με βάση την μετρούμενη οπτική πυκνότητα (O.D.). Ο υπολογισμός αυτός γίνεται με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA).



**Εικόνα 16: Καμπύλη προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.**

### **3.2.5 Ανάλυση πρωτεϊνών με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση**

Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα βασικά υλικά της μεθόδου είναι η πηκτή πολυακρυλαμιδίου και το άλας νατρίου του θειϊκού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS είναι ένα ανιονικό αντιδραστήριο που αφού προσδεθεί στις πρωτεΐνες, τις αποδιατάσει και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, έχοντας ως αποτέλεσμα η ηλεκτροφορική τους ικανότητα να είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους τους. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα διαχωρισμού – separating gel και το πήκτωμα επιστοίβαξης – stacking gel. Οι θέσεις εισαγωγής δειγμάτων (διαδρομές) δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η



οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό της πηκτής. Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκε η συσκευή της Bio-Rad. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστίθενται πρώτα το διάλυμα πηκτής διαχωρισμού με πυκνότητα σε πολυακρυλαμίδιο 10% και pH 8,8. Ακολούθως παρασκευάζεται και στοιβάζεται διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάξης πυκνότητας πολυακρυλαμιδίου 4,5% και pH 6,8.

Η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) αποτελείται από 10 % ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 0,04% v/v APS, 0,1% v/v TEMED σε ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (separating gel buffer): 0,375 Tris-HCl pH 8,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS. Η πηκτή επιστοιβάξης (Stacking gel) αποτελείται από ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο, 0,0625% v/v APS, 0,1% v/v TEMED σε ρυθμιστικό διάλυμα επιστοιβάξης (stacking gel buffer): 0,125 Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer) αποτελείται από 0,05 M Tris pH 8,3, 0,38 M γλυκίνη, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS και η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση στα 120V.

### **3.2.6 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)**

Αφού ολοκληρωθεί η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, η πηκτή με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες τοποθετείται με μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα μεταφοράς Tris-Borate pH 8.8 (125mM Tris, 0.2% SDS, 0.5mM DTT, ρύθμιση του pH με άλας του βορικού οξέος) στη συσκευή ημιξηρής μεταφοράς (semi-dry transfer, peqlab® Semi-Dry Blotter). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή πολυακρυλαμιδίου τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε διηθητικό χαρτί μέσα στη συσκευή μαζί με διάλυμα μεταφοράς και η μεταφορά έγινε στα 10V για 60 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά, η μεμβράνη βάφεται με διάλυμα Ponceau S (0,5% w/v Ponceau, 1% οξικό οξύ) και ξεπλένεται με H<sub>2</sub>O έως ότου εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Έπειτα η μεμβράνη ξεπλένεται με PBS-Tween, μέχρι να φύγουν τα υπολείματα του Ponceau, και ακολουθεί επώαση σε διάλυμα κορεσμού 5% γάλα σε PBS-Tween για 1 ώρα, έτσι ώστε να κορεσθούν οι θέσεις δέσμησης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Ακολούθησε πλύση της μεμβράνης με PBS-Tween και ολονύκτια επώαση με το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολουθεί ξέπλυμα με PBS-Tween και επώαση με δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραίωση σε 5% γάλα σε PBS-Tween για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα η μεμβράνη ξεπλένεται με PBS-Tween και ακολουθεί εμφάνιση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επωάζεται για ένα λεπτό σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1,25mM σε 0.1M Tris-Cl pH 8.5), στο οποίο προστέθηκαν 30μl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 100μl κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση

αντιδρά με το υπεροξειδίο δίνοντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με το κουμαρικό οξύ δίνοντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν την λουμινόλη δίνοντας φως. Η λήψη εικόνων έγινε στη συσκευή Uvitec Cambridge Chemiluminescence Imaging System και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με το λογισμικό Alliance Software.

### **3.2.7 Έλεγχος μεταγραφικής ενεργότητας**

#### **3.2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσής του**

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο NucleoZOL και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία με μικρές παραλλαγές. Πρόκειται για ένα φαινολικό αντιδραστήριο που επιτυγχάνει την απομόνωση ολικού RNA. Σε στείρες συνθήκες έγινε προσθήκη 400 μl NucleoZOL σε κύτταρα που ιζηματοποιήθηκαν μετά την αιώρησή τους σε κρύο PBS. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 160 μl RNase free H<sub>2</sub>O. Παρατηρούνται οι δύο φάσεις, υδατική και φαινολική και στη συνέχεια αναμιγνύονται με ισχυρή ανάδευση με vortex για 30 s. Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 15 λεπτά 12000 x g σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρούνται τρεις φάσεις, μια υπερκείμενη υδατική που περιέχει το RNA, μια ενδιάμεση που περιέχει το DNA και μια φαινολική που περιέχει πρωτεΐνες. Το μεγαλύτερο μέρος της υδατικής φάσης ~500 μl μεταφέρεται σε σωληνάκια 1,5ml και προστίθεται 100% ισοπροπανόλη σε αναλογία 1:1. Γίνεται επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά 12000 x g. Το RNA κατακρημνίζεται και το ίζημα πλένεται με 400 μl 75% αιθανόλης και φυγοκέντρηση τριών λεπτών 12000 x g. Αφαιρείται η αιθανόλη και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση 12000 x g για 30 sec και αφαιρούνται τα υπολείμματα αιθανόλης. Το RNA επαναιωρείται σε 30 μl ελεύθερο ριβονουκλεασών H<sub>2</sub>O. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA και η εκτίμηση της καθαρότητάς του πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (ThermoFischer). Πιο συγκεκριμένα με μια πολύ μικρή ποσότητα 2 μl του δείγματος RNA προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του και ο λόγος απορρόφησης 260/280nm. Ο λόγος αυτός αποτελεί μέτρο της καθαρότητας του RNA και των προσμίξεων από DNA ή πρωτεΐνες που τυχόν συνυπάρχουν. Υψηλής καθαρότητας RNA με ελάχιστες προσμίξεις έχει λόγο που κυμαίνεται από 1,7 ως 2. Στη μέτρηση των δειγμάτων ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

#### **3.2.7.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR, RT-PCR)**

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχύονται συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο

το προϊόν που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι εξειδικευμένο και μπορεί να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Η Real-Time PCR αποτελεί μία παραλλαγή της γνωστής αντίδρασης PCR. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση (ποιοτική και ποσοτική) της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, παράγονται αντίγραφα cDNA από εκμαγείο mRNA. Στο πρώτο βήμα χρησιμοποιείται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (σύνθεση πρώτου κλώνου). Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η σύνθεση του επόμενου κλώνου και στα ακόλουθα βήματα ολοκληρώνεται η κανονική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

✓ Σύνθεση cDNA : Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση που συνθέτει συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο mRNA. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit της εταιρείας Applied Biosystems και εκτελέστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα η αντίδραση ετοιμάζεται στον πάγο ως εξής:

- 10μl δείγματος RNA 1μg
- 2μl RT Buffer (αρχικής συγκέντρωσης 10x)
- 0,8μl dNTP mix (αρχικής συγκέντρωσης 100mM)
- 2μl τυχαίων εκκινητών
- 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης
- 4,2μl H<sub>2</sub>O

Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στις παρακάτω συνθήκες:

- 25°C για 10 λεπτά (σύνδεση των εκκινητών)
- 37°C για 120 λεπτά (ανάστροφη μεταγραφή)
- 85°C για 5 λεπτά (απενεργοποίηση)
- 4°C ->ψύξη

Στα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 80μl ddH<sub>2</sub>O (διπλά αποσταγμένο νερό) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

✓ PCR πραγματικού χρόνου : Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης ενός αρχικού δείγματος DNA μέσω της συνεχούς ανίχνευσης της ενίσχυσής του. Η ενίσχυση του αρχικού δείγματος βασίζεται στη κλασική PCR με τα διαδοχικά στάδια της αποδιάταξης των δύο κλώνων, της σύνδεσης των εκκινητών και της επιμήκυνσης από

μια DNA πολυμεράση. Η ανίχνευση της ενίσχυσης βασίζεται στη πρόσδεση στα ενισχυόμενα μόρια DNA μιας φθορίζουσας ουσίας και ανίχνευση της έντασης του φθορισμού. Ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), που επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος στο δίκλωνο DNA. Η φθορίζουσα ουσία μπορεί να είναι ειδική για μια ενισχυόμενη αλληλουχία επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό της από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών.

Στη παρούσα εργασία η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα LightCycler® 96 System (Roche) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Syber Green mix (Applied Biosystems) το οποίο περιέχει την Taq πολυμεράση, τη φθορίζουσα χρωστική Sybr Green I, Mogul2, dNTPs και σταθεροποιητές. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για το cDNA του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (PAI-1) αλλά και αυτό του 18S που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, καθώς τα επίπεδα mRNA του τελευταίου δεν επηρεάζονται στις πειραματικές συνθήκες που εξετάζονται.

Παρασκευάζονται μείγματα για τα διαφορετικά γονίδια που περιέχουν Sybr Green Mix και τους εμπρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 10 pMol/μl ο καθένας. Για το διάλυμα χρησιμοποιείται αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O απαλλαγμένο από RNάσες και DNάσες (ThermoFisher Scientific). Σε 7,5μl μείγματος προσθέτουμε 2,5μl cDNA. Κάθε συνθήκη ελέγχθηκε εις τριπλούν, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αφενός δείγμα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA που έγινε απουσία ανάστροφης μεταγραφάσης και αφετέρου δείγμα με H<sub>2</sub>O αντί για cDNA.

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τα γονίδια 18S και PAI-1 είναι οι ακόλουθες:

1. 95°C για 180 δευτερόλεπτα
2. 95°C για 3 δευτερόλεπτα
3. 60°C για 30 δευτερόλεπτα
4. 95°C για 10 δευτερόλεπτα
5. Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές
6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης

Οι συνθήκες της αντίδρασης για το γονίδιο της EPO είναι οι ακόλουθες:

1. 50°C για 2 λεπτά
2. 94°C για 10 λεπτά
3. 95°C για 15 δευτερόλεπτα

4. 60°C για 1 λεπτό
  5. Επανάληψη σταδίων 2, 3 και 4 για 39 φορές
  6. 60-90°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης
- ✓ Ποσοτικοποίηση του mRNA: Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA γίνεται με τη μέθοδο της  $\Delta\Delta C_t$  (διαφορά της διαφοράς των κύκλων). Για κάθε δείγμα, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συνθήκη, υπολογίζεται αρχικά η διαφορά  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ) του γονιδίου στόχου (PAI-1, EPO) και του 18S και στη συνέχεια από το  $\Delta C_t$  κάθε δείγματος αφαιρείται το  $\Delta C_t$  του δείγματος μάρτυρα (18S). Στη συνέχεια υπολογίζεται η δύναμη με βάση το  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  που εκφράζει τη μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου στόχου σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα.

### 3.2.8 Απομόνωση και πολλαπλασιασμός τμημάτων της αλληλουχίας cDNA του HIF-2α με PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA *in vitro*, με σκοπό τα προϊόντα αυτά να ληφθούν σε σημαντική ποσότητα. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε, ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια DNA για να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς τη μία αλυσίδα του δίκλωνου DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε (εκμαγείο). Έτσι, καθίσταται δυνατός ο υβριδισμός τους με τις αλυσίδες του DNA-στόχου και ο πολλαπλασιασμός των γονιδιακών αλληλουχιών που οριοθετούνται από τους 2 εκκινητές με τη χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών.

Η αντίδραση αποτελείται από τρία στάδια:

- αποδιάταξη του DNA εκμαγείου (denaturation)
- υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Η αποδιάταξη γίνεται με θέρμανση του εκμαγείου (~95°C). Ακολουθεί η ψύξη του μίγματος της αντίδρασης για να επιτευχθεί η πρόσδεση των εκκινητών στους κλώνους του εκμαγείου (~50-60 °C). Τέλος, γίνεται επώαση του μείγματος στους 72°C, ώστε να δράσει η θερμοανθεκτική πολυμεράση και να επιμηκύνει τους εκκινητές. Η διαδικασία αυτή που περιγράφηκε αποτελεί έναν πλήρη κύκλο μιας αντίδρασης PCR. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται, ενώ απαιτούνται περίπου 2030 κύκλοι για να ολοκληρωθεί η διαδικασία και να ενισχυθεί αποτελεσματικά το επιθυμητό θραύσμα του DNA από το εκμαγείο. Το πλεονέκτημα της μεθόδου

είναι η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro* (χωρίς τη χρήση ζωντανών κυττάρων) σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (λίγες ώρες). Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν το τμήμα HIF2α 640-679 του αγρίου τύπου (WT) καθώς και τα τμήματα του HIF2α 640-679 που φέρουν τις μεταλλάξεις S672A, L662/667A, S672A/L662/667A.

Το μίγμα της αντίδρασης ήταν το εξής:

- 50ng από το εκμαγείο pFLAG-CMV-2-full lenght-WT-HIF2, pFLAG-CMV-2-full lenght-SA-HIF2, pflag-CMV-2-full lenght-LA-HIF2, pflag-CMV-2-full lenght-SA/LA-HIF2
- 10mM dNTPs
- 1x Thermopol Vent Buffer
- 2,5 units Vent πολυμεράση
- 20 pmol πρόσθιου εκκινητή (forward primer)
- 20 pmol οπίσθιου εκκινητή (reverse primer)
- H<sub>2</sub>O έως ότου ο όγκος της αντίδρασης γίνει ίσος με 50 μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 5min → 94°C Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1min → 94°C Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- 1min → 60°C Υβριδοποίηση εκκινητών και επιμήκυνση
- 2min → 72°C Επιμήκυνση

Αριθμός κύκλων: 30

- 5min → 72°C Τελική επιμήκυνση

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 2% και καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση του kit της εταιρείας Isolation II PCR and Gel Kit (Bioline).

### 3.2.9 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ηλεκτροχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μεγαλομορίων, μεταξύ άλλων, και DNA. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων (το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που διαθέτει) σε υγρό μέσο (ρυθμιστικό διάλυμα), υπό επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου καθορίζει την απόσταση που διανύουν τα φορτισμένα μόρια σε δεδομένο χρόνο, άρα το πόσο

καλά θα διαχωριστούν. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι το μέγεθός τους, η συγκέντρωση του πηκτώματος και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος.

Η ανίχνευση των τμημάτων DNA στο πήκτωμα γίνεται με τη χρήση ουσιών που δεσμεύονται στο DNA και φθορίζουν παρουσία ακτινοβολίας, όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο διαθέτει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την εκπέμπει στο ορατό φάσμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αгарόζης με συγκέντρωση 1,5% και 2%, ρυθμιστικό διάλυμα TAE (40 mM M Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8), και βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml. Επιπλέον, πριν την φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος τα δείγματα DNA αναμιγνύονται με πυκνό διάλυμα (Loading Buffer). Η σύσταση του πυκνού διαλύματος φορτώματος είναι η εξής:

- Γλυκερόλη 12,5 % v/v
- Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,42 % w/v
- Κυανούν του ξυλενίου 0,42 % w/v

### **3.2.10 Κλωνοποίηση των τμημάτων cDNA που κωδικοποιούν την αμινοξική αλληλουχία 640-679 του HIF-2α σε πλασμιδιακό φορέα**

#### **3.2.10.1 Πέψεις**

Δύο τμήματα DNA στα οποία έχει γίνει πέψη με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο μπορούν να συνδεθούν προσωρινά λόγω της υβριδοποίησης που θα λάβει μεταξύ των άκρων τους (κολλώδη άκρα). Η σύνδεση αυτή δύναται να μονιμοποιηθεί με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικών δεσμών. Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι ομοιοπολικοί δεσμοί και η δημιουργία τους επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου λιγάση του DNA (DNA ligase). Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνδεση ενός κομμένου πλασμιδιακού φορέα με οποιοδήποτε τμήμα DNA με συμβατά κολλώδη άκρα, ως πρώτο βήμα για εφαρμογές κλωνοποίησης. Στην παρούσα μελέτη, τόσο τα τμήματα του HIF-2α όσο και ο πλασμιδιακός φορέας υπέστησαν πέψη με χρήση του περιοριστικού ενζύμου BamHI.

Για το DNA-ένθεμα και τον πλασμιδιακό φορέα τα μίγματα της πέψης ήταν τα εξής:

- 0.5ng/μl DNA ενθέματος ή 1ng/μl pEGFP-C1
- 1x τελική συγκέντρωση Cutsmart® Buffer (50 mM Οξικό Κάλιο, 20 mM Tris-οξικό, 10 mM οξικό μαγνήσιο, 100 μg/ml BSA, pH 7.9)
- 20 units BamHI-HF
- H<sub>2</sub>O ως τελικό όγκο τα 50 μl

Κατά την αναμονή ~4 h για την ολοκλήρωση των παραπάνω αντιδράσεων πέψης με BamHI, έγινε επώαση του πλασμιδιακού φορέα με 10 units αλκαλικής φωσφατάσης (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP/CIP) στο μέσον της επώασης, με σκοπό την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων από τα 5' άκρα του πλασμιδιακού φορέα, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανένωση των άκρων του. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, στα 90 V. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε λυχνία UV για να καταστούν ορατές οι ζώνες του DNA που μας ενδιαφέρουν και έγινε αποκοπή αυτών από το πήκτωμα.

### **3.2.10.2 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)**

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο του kit «Isolate II PCR and Gel Kit» της εταιρείας Bioline για gel extraction κατέστη εφικτή η ανάκτηση του DNA που μας ενδιαφέρει (ένθεμα και πλασμιδιακός φορέας) από το πήκτωμα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε καθαρό χειρουργικό νυστέρι για την αποκοπή των τμημάτων πηκτώματος αγαρόζης που περιέχουν το επιθυμητό DNA. Απομακρύνθηκε η περίσσεια αγαρόζης και κατόπιν το επιθυμητό τμήμα της πηκτής τοποθετήθηκε σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (τύπου eppendorf) και ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό με σκοπό τον καθορισμό του βάρους του (σε mg). Ακολούθως, στο σωληνάκι με το κομμάτι του πηκτώματος προστέθηκαν ορισμένα μl «Binding Buffer CB» του kit της εταιρείας Bioline ανάλογα με τη μάζα του εκάστοτε κομματιού πηκτώματος που εξήχθηκε (αναλογία μάζας πηκτώματος/όγκος Binding Buffer CB: 1:2) με σκοπό την διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Το διάλυμα αυτό περιέχει έναν χαοτροπικό παράγοντα που είναι η υδροχλωρική γουανιδίνη. Έπειτα έγινε επώαση του δείγματος στους 50°C για 5-10 λεπτά με ενδιάμεσες έντονες αναδεύσεις μέχρι το κομμάτι της πηκτής να διαλυθεί πλήρως. Εν συνεχεία, το δείγμα με το DNA φορτώθηκε σε ειδική στήλη ώστε το DNA να προσδεθεί στη μεμβράνη της στήλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 30 sec στα 11000 g και το έκλουσμα απορρίφθηκε. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με το διάλυμα «Wash Buffer CW» που περιέχει αιθανόλη για να διατηρηθεί η σύνδεση του DNA στη μεμβράνη. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση 30 sec στα 11000g. Το έκλουσμα απορρίφθηκε. Το στάδιο αυτό της έκπλυσης μπορεί να επαναληφθεί προαιρετικά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 2 λεπτά στα



11000g με σκοπό να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη. Τέλος η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου (τύπου errendorf) και προστέθηκαν 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O απευθείας πάνω στη μεμβράνη με σκοπό την έκλυση του DNA. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Τέλος έγινε φυγοκέντρωση 1 λεπτού στα 11000g με σκοπό την παραλαβή του DNA. Το DNA συντηρήθηκε στους -20 °C.

Εν συνεχεία, είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των τμημάτων DNA που θα χρησιμοποιηθούν. Για την ποσοτικοποίηση γίνεται μέτρηση στο NanoDrop<sup>TM</sup> γνωστού όγκου από το υποψήφιο ένθεμα, καθώς και από τον πλασμιδιακό φορέα.

### 3.2.10.3 Αντίδραση λιγάσης (ligation)

Για την αντίδραση λιγάσης το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

- Πλασμιδιακό φορέα pGFP-C1 και ένθεμα cDNA των αμινοξέων 640-679 του HIF-2α σε αναλογία 1:5
- 400 units λιγάση του DNA T4
- 1x τελική συγκέντρωση Buffer λιγάση του DNA T4 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5)
- H<sub>2</sub>O ως τελικό όγκο 20  $\mu$ l

Η αντίδραση λιγάσης έγινε με ολονύκτια επώαση στους 16°C.

### 3.2.10.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός είναι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες στη μοριακή βιολογία και περιλαμβάνει τη γενετική τροποποίηση ενός κυττάρου, η οποία προκύπτει από την άμεση πρόσληψη εξωγενούς γενετικού υλικού, από τον περιβάλλοντα χώρο διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Προκειμένου ο μετασχηματισμός να είναι επιτυχής, απαιτείται τα βακτηριακά κύτταρα να είναι επιδεκτικά στην πρόσληψη ξένου νουκλεϊκού οξέος. Επιπρόσθετα, ο μετασχηματισμός αποτελεί έναν από τους τρόπους οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς στα βακτήρια και συνεπώς αποτελεί μία φυσιολογική τους ιδιότητα.

Στη παρούσα εργασία μετασχηματίστηκαν επιδεκτικά κύτταρα E.Coli TOP10. Σε 50  $\mu$ l του αιωρήματος των δεκτικών βακτηρίων προστέθηκε το πλασμιδιακό DNA (50-100 ng DNA). Τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ για 2 λεπτά στους 42°C και 3 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν προστέθηκε θρεπτικό υλικό 0,5 ml L.B. (LURIABROTH-Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) και ακολούθησε επώαση των βακτηρίων για 1 ώρα στους 37°C. Το στάδιο αυτό εξυπηρετεί την ανάπτυξη των

βακτηριακών κυττάρων από τις θερμοκρασιακές εναλλαγές και δίνεται στα βακτήρια ο χρόνος να εκφράσουν τα ένζυμα που θα μεταβολίσουν το αντιβιοτικό επιλογής. Μετά από φυγοκέντρηση 7 δευτερολέπτων αφαιρέθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου και έγινε επαναιώρηση των κυττάρων στον εναπομείναντα όγκο (λιγότερο από 100  $\mu$ l). Όλη η ποσότητα των επαναιωρημένων κυττάρων επιστρώθηκε στην επιφάνεια τρυβλίου με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (2% άγαρ) που περιέχει 100  $\mu$ g/ml αμπικιλίνη ή καναμικίνη, ως αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 16-18 ώρες.

Την επόμενη μέρα εμβολιάστηκαν ίσοι όγκοι (3 ml) L.B παρουσία αντιβιοτικού, έκαστος με μία διαφορετική βακτηριακή αποικία. Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν ολονύκτια στους 37°C για 16-18 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (~250 rpm).

#### **3.2.10.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (mini-preparation)**

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πλέον επιθυμητή και προτιμώμενη για απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα. Η διαδικασία έχει ως εξής: αρχικά χρησιμοποιούνται μικρές (3 ml) καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων που περιέχουν το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 1-2 λεπτά στις 4000 g και το ίζημα επαναιωρείται σε 150  $\mu$ l διαλύματος TE (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA) στο οποίο έχει προστεθεί 0,1 mg/ml RNase A. Το EDTA ως χηλικός παράγοντας δεσμεύει δισθενή κατιόντα τα οποία δρουν σαν συμπράγοντες νουκλεασών που μπορεί να πέσουν το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA. Επίσης συμβάλλει στην αποσταθεροποίηση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η RNase συμβάλλει στην αποικοδόμηση του RNA κατά τη λύση των κυττάρων. Ακολούθως προστίθενται 200  $\mu$ l διαλύματος λύσης κυττάρων TENS (200 mM NaOH, 1% SDS). Το απορρυπαντικό SDS συνεισφέρει στη διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) βοηθά στη θραύση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ παράλληλα διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA μετατρέποντας το χρωμοσωμικό και το προς απομόνωση πλασμιδιακό DNA σε μονόκλωνο. Ακόμα το SDS αποδιατάσσει τις περισσότερες πρωτεΐνες των βακτηρίων. Ακολούθως προστίθενται 150  $\mu$ l διαλύματος εξουδετέρωσης 3 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ή  $\text{CH}_3\text{COOK}$  pH 5,2. Το διάλυμα αυτό μειώνει την αλκαλικότητα του δείγματος. Υπό αυτές τις συνθήκες οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του μονόκλωνου DNA επανασχηματίζονται και έτσι το μονόκλωνο DNA μετατρέπεται σε δίκλωνο. Ωστόσο μόνο το πλασμιδιακό DNA που είναι μικρού μεγέθους αναδιατάσσεται σε αντίθεση με το χρωμοσωμικό το οποίο παραμένει μονόκλωνο. Ενώ λοιπόν το δίκλωνο DNA είναι διαλυτό, το μονόκλωνο χρωμοσωμικό DNA, το SDS και οι αποδιαταγμένες κυτταρικές πρωτεΐνες συσσωματώνονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων για να σχηματίσουν ένα λευκό ίζημα. Ακολούθως,

φυγοκέντρωση σε 10.000 g για 10 λεπτά οδηγεί στο διαχωρισμό του προαναφερθέντος λευκού ιζήματος από το διαλυμένο πλασμιδιακό DNA το οποίο εμφανίζεται στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρου (τύπου eppendorf), κατακρημνίστηκε με προσθήκη 100% ισοπροπανόλη, ακολούθως μεταφέρθηκε στους -20 °C για 30 min και έπειτα αφού έγινε φυγοκέντρωση σε 12.000 g για 15 λεπτά απομακρύνθηκε η ισοπροπανόλη και έγινε επαναιώρηση του ιζήματος (πλασμιδιακό DNA) σε 20-30 μl απιονισμένου H<sub>2</sub>O.

### **3.2.10.6 Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (έλεγχος εισαγωγής ενθέματος και έλεγχος προσανατολισμού)**

Το προς ανάλυση πλασμίδιο υποβλήθηκε σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για να διαπιστωθεί η παρουσία του ενθέματος και ο προσανατολισμός με τον οποίο εισήχθη αυτό στον πλασμιδιακό φορέα. Για να διαπιστωθεί η παρουσία του ενθέματος έγιναν πέψεις με το ένζυμο BamHI, ενώ για τον προσανατολισμό χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα BglI και XhoI. Συγκεκριμένα οι αντιδράσεις πέψεις περιείχαν:

- 2 μg από κάθε πλασμίδιο
- 1x τελική συγκέντρωση Cutsmart® Buffer (50 mM Οξικό Κάλιο, 20 mM Tris-Οξικό, 10 mM Οξικό Μαγνήσιο, 100 μg/ml BSA, pH 7,9)
- 4 units από κάθε ένζυμο
- H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 20μl

Οι πέψεις έγιναν στους 37°C για 2 ώρες και ακολούθησε έλεγχος με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **3.2.10.7 Έλεγχος προσανατολισμού του ενθέματος με PCR**

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν ο προσανατολισμός του ενθέματος στο πλασμίδιο είναι ο σωστός, το πλασμιδιακό DNA ελέγχθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το μίγμα της αντίδρασης ήταν το εξής:

- 50ng από το εκμαγείο pEGFP-C1-640-679-SA/LA-HIF2
- 10mM dNTPs
- 1x Thermopol Taq Buffer
- 2,5 units Taq πολυμεράση
- 20 pmol πρόσθιου εκκινητή (forward primer)

- 20 pmol οπίσθιου εκκινητή (reverse primer)
- H<sub>2</sub>O έως ότου ο όγκος της αντίδρασης γίνει ίσος με 50 μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

- 5min → 94°C
- 1min → 94°C
- 1min → 50°C
- 3min → 72°C

Αριθμός κύκλων: 30

5min → 72°C

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 2% για έλεγχο του προϊόντος της PCR.

### 3.2.11 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η τεχνική αυτή καθιστά εφικτή την παρατήρηση πρωτεϊνών και τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού τους. Σε κύτταρα που έχουν μονιμοποιηθεί σε καλυπτρίδες και οι μεμβράνες τους έχουν γίνει διαπερατές, γίνεται επίδραση με αντίσωμα για την υπό μελέτη πρωτεΐνη-αντιγόνο. Στη συνέχεια γίνεται επίδραση με δευτερεύον αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και φέρει συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος το οποίο προσπίπτει κάθετα στο επίπεδο των δειγμάτων. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού που φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός του HIF-2α μετά από επίδραση με τον φλεγμονώδη παράγοντα TNF-α. Τα κύτταρα αρχικά επώαστηκαν πάνω σε καλυπτρίδες και την μέρα του πειράματος κάλυπταν το 60-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 λεπτά. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με PBS και έπειτα οι κυτταρικές μεμβράνες έγιναν διαπερατές με επίδραση 0,1% Triton X-100 σε PBS για 15 λεπτά στους 4°C. Επαναλήφθηκαν τρεις πλύσεις με PBS και στη συνέχεια έγινε κατεργασία με διάλυμα κορεσμού 1% BSA σε PBS-Tween για να καλυφθούν πιθανές θέσεις μη ειδικής αλληλεπίδρασης με το αντίσωμα. Στη συνέχεια έγινε επώαση με αντίσωμα έναντι του HIF-2α για 16 ώρες στους 4°C. Την επόμενη μέρα έγιναν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με PBS και ακολούθησε επώαση με αντίσωμα έναντι της IgG ποντικού συνδεδεμένο με Cy3 (εκπέμπει στα

564 nm) σε αραιώση 1:500. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών PBS. Έπειτα έγιναν πλύσεις των καλυπτρίδων με αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O. Εν συνεχεία οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα διατήρησης φθορισμού MOWIOL (Sigma) στο οποίο έχει προστεθεί η φθορίζουσα χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) που δεσμεύεται στη χρωματίνη κι έτσι επιτυγχάνεται η «βαφή» του πυρήνα των κυττάρων. Οι καλυπτρίδες επώαστηκαν στο σκοτάδι για 60 λεπτά για να στερεωθούν στις αντικειμενοφόρους πλάκες και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού Zeis Axioplan, με μεγενθυντικούς φακούς 40X και 100X. Πιθανή φύλαξη των αντικειμενοφόρων με τις προσκολλημένες καλυπτρίδες πραγματοποιείται στους -20°C.

### 3.2.12 Φθορισμός

Η τεχνική αυτή καθιστά εφικτή την παρατήρηση πρωτεϊνών και τη μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού τους χωρίς την χρήση αντισώματος. Τα κύτταρα αφού υποστούν διαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει τον επίτοπο GFP σε σύντηξη με την πρωτεΐνη που θέλουμε, μονιμοποιούνται σε καλυπτρίδες και ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους. Η Green Fluorescent Protein (GFP) αποτελείται από 298 αμινοξέα και φθορίζει πράσινη όταν διεγερθεί από μπλέ φως. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού που φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός κλωνοποιημένων τμημάτων του HIF-2α με σκοπό την εύρεση πιθανού σήματος πυρηνικού εξόδου. Τα κύτταρα αρχικά επώαστηκαν πάνω σε καλυπτρίδες και την μέρα του πειράματος κάλυπταν το 60-80% της επιφάνειας της καλυπτρίδας. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 λεπτά. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με PBS και έπειτα έγιναν πλύσεις των καλυπτρίδων με αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O. Εν συνεχεία οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα διατήρησης φθορισμού MOWIOL (Sigma) στο οποίο έχει προστεθεί η φθορίζουσα χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) που δεσμεύεται στη χρωματίνη κι έτσι επιτυγχάνεται η «βαφή» του πυρήνα των κυττάρων. Οι καλυπτρίδες επώαστηκαν στο σκοτάδι για 60 λεπτά για να στερεωθούν στις αντικειμενοφόρους πλάκες και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού Zeis Axioplan, με μεγενθυντικούς φακούς 40X και 100X. Πιθανή φύλαξη των αντικειμενοφόρων με τις προσκολλημένες καλυπτρίδες πραγματοποιείται στους -20°C.

### 3.2.13 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων. Συγκεκριμένα η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τη χρήση μη λιπιδικού κατιονικού πολυμερούς (Turbofect, Fermentas ή Polyethylenimine (PEI), Jena Bioscience) .

Αρχικά γίνεται η προετοιμασία του μείγματος. Η γενική αναλογία DNA:μέσο διαμόλυνσης είναι 1:2 σε σωληνάκι με θρεπτικό υλικό απουσία αντιβιοτικών και ορού. Η ποσότητα του πλασμιδιακού DNA ανάλογα με τη διάμετρο του πιάτου ποικίλλει από 1μg έως 8μg για πλάκες των 24 πηγαδίων και πιάτα των 10cm αντίστοιχα. Μετά την προσθήκη του DNA και του μέσου διαμόλυνσης ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα. Κατόπιν το μείγμα διασπείρεται πάνω από τα κύτταρα στα οποία έχουμε ήδη προσθέσει DMEM με 5% FBS και αφήνονται για επώαση 4 ωρών στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Μετά το πέρας της επώασης αντικαθίσταται το θρεπτικό με πλήρες και τα κύτταρα είτε επωάζονται για 4 ώρες, προστίθεται ουσία και επωάζονται για 16 ώρες είτε επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Την επόμενη ημέρα γίνεται η κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που ακολουθεί.

### 3.2.14 Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation, IP)

Με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης είναι δυνατή η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από εκχυλίσματα κυττάρων με τη χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της εν λόγω πρωτεΐνης. Το αντίσωμα που έχει δεσμεύσει την πρωτεΐνη μπορεί στη συνέχεια να απομονωθεί με τη χρήση σφαιριδίων σεφαρόζης-πρωτεΐνης A (Protein A-Sepharose), λόγω της ικανότητας της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus* να δεσμεύεται στη σταθερή περιοχή των IgG αντισωμάτων και έτσι επιτυγχάνεται ο εξειδικευμένο διαχωρισμό/καθαρισμό μιας πρωτεΐνης μέσα από ένα μίγμα πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση για τα κλωνοποιημένα τμήματα του HIF-2α με σύντηξη με επίτοπο GFP. Χρησιμοποιούνται σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A, τα οποία εξισορροπούνται με 3 πλύσεις των 10 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Hepes 7.6, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> και 1% Triton-X-100, και λαμβάνονται με σύντομη φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του ρυθμιστικού. Επίσης, κατάλληλος όγκος από τα κυτταρικά εκχυλίσματα, τα οποία λύθηκαν με το ίδιο ρυθμιστικό με την προσθήκη PMSF και 1M DTT, επωάζεται με 1γ αντί-GFP ορού για περίπου 2 ώρες στους 4°C, ούτως ώστε να αλληλεπιδράσει ο αντί-ορός με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που αναγνωρίζει. Έπειτα, τα εκχυλίσματα επωάζονται με τα beads για περίπου 16 ώρες (overnight) στους 4°C, ώστε να δεσμευτούν οι πρωτεΐνες με τα σφαιρίδια. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το ρυθμιστικό

διάλυμα. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλύονται με όξινο διάλυμα γλυκίνης pH 2-2.5, το οποίο εξουδετερώνεται με 1M Tris pH 10.4, αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση και για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του HIF-2α με τον ARNT. Χρησιμοποιήθηκαν τα p-FLAG-beads. Τα σφαιρίδια εξισορροπούνται με 3 πλύσεις των 10 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα 25mM Hepes 7.6, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> και 1% Triton-X-100, και λαμβάνονται με σύντομη φυγοκέντρωση και απομάκρυνση του ρυθμιστικού. Έπειτα, κατάλληλος όγκος από τα κυτταρικά εκχυλίσματα, τα οποία λύθηκαν με το ίδιο ρυθμιστικό με την προσθήκη PMSF και 1M DTT, επωάζεται με τα beads για περίπου 4 ώρες στους 4°C ώστε να αλληλεπιδράσουν τα αντισώματα με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν δεσμεύοντας τις στα σφαιρίδια. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με το ρυθμιστικό διάλυμα. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλύονται με όξινο διάλυμα γλυκίνης pH 2-2.5, το οποίο εξουδετερώνεται με 1M Tris pH 10.4, αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση.

### **1.2.15 Αλληλούχιση**

Η αλληλούχιση των πλασμιδιακών κατασκευών του τμήματος 640-679 του αγρίου τύπου HIF-2α καθώς και των μεταλλαγμάτων SA, LA, SA/LA πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Eurofins Genomics.

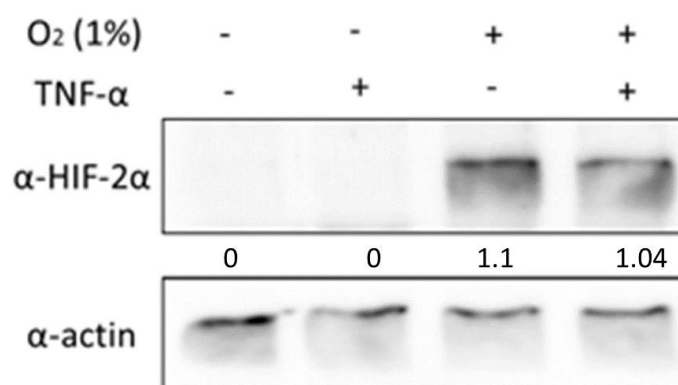
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ HIF-2α ΑΠΟ ΤΟΝ TNF-α

#### 4.1.1 Επίδραση του παράγοντα TNF-α στην έκφραση της πρωτεΐνης του HIF-2α στην υποξία

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση στην πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α από τον παράγοντα TNF-α, κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 επωάστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας υπό την επίδραση ή όχι του παράγοντα TNF-α (10ng/ml) για 16 ώρες (**Εικόνα 17**).

Παρατηρήθηκε πως ο TNF-α δεν μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-2α ούτε σε συνθήκες νορμοξίας ούτε σε συνθήκες υποξίας. Συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του HIF-2α παρουσία του TNF-α.



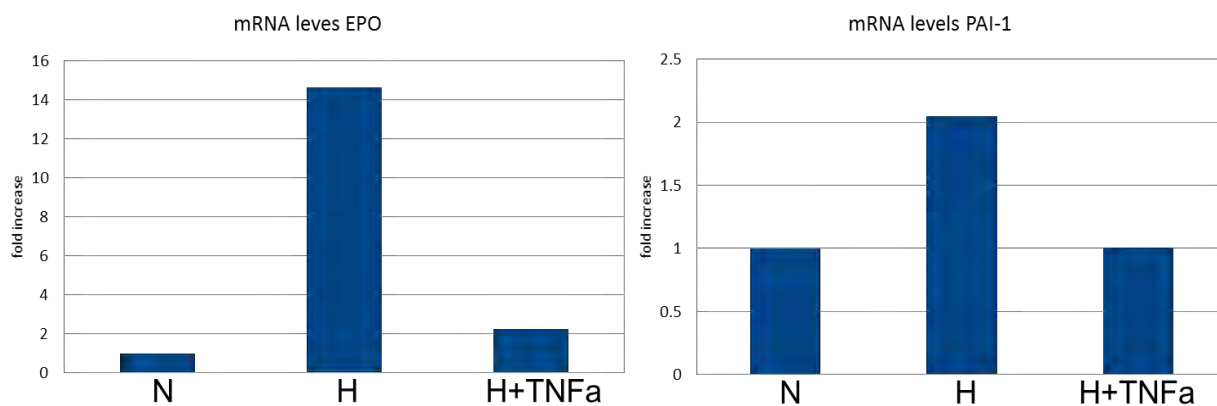
**Εικόνα 17: Επίδραση του παράγοντα TNF-α στην πρωτεϊνική έκφραση του HIF-2α.** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του HIF-2α και της ακτίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επωάστηκαν σε νορμοξία και υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες, απουσία ή παρουσία του παράγοντα φλεγμονής TNF-α (10ng/ml). Οι αριθμοί κάτω από τις εικόνες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους από 4 ανεξάρτητα πειράματα.

#### 4.1.2 Επίδραση του παράγοντα TNF-α στην έκφραση γονιδίων στόχων του HIF-2α σε υποξία

Το επόμενο ερώτημα που εξετάστηκε ήταν εάν ο παράγοντας φλεγμονής TNF-α, επηρεάζει τον HIF-2α σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων στόχων του. Εξετάστηκε η έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων στόχων του HIF-2α και συγκεκριμένα η έκφραση των γονιδίων της ερυθροποιητίνης *EPO* και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 *PAI-1* με τη μέθοδο της Real Time PCR σε κύτταρα Huh7 (**Εικόνα 18**).

Παρατηρήθηκε πως όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υποξίας για 16 ώρες, τα επίπεδα mRNA της *EPO* αυξήθηκαν σε σύγκριση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε νορμοξία. Ωστόσο, η ταυτόχρονη επίδραση της υποξίας και του TNF-α, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του mRNA της *EPO* σε σύγκριση με την επαγωγή της υποξίας. Αντίστοιχη εικόνα έδωσαν και τα πειράματα για τα επίπεδα mRNA του *PAI-1*, όπου σε συνθήκες υποξίας επάχθηκε το γονίδιο σε σχέση με τη νορμοξία ενώ παρουσία TNF-α σε υποξία η επαγωγή μειώνεται.



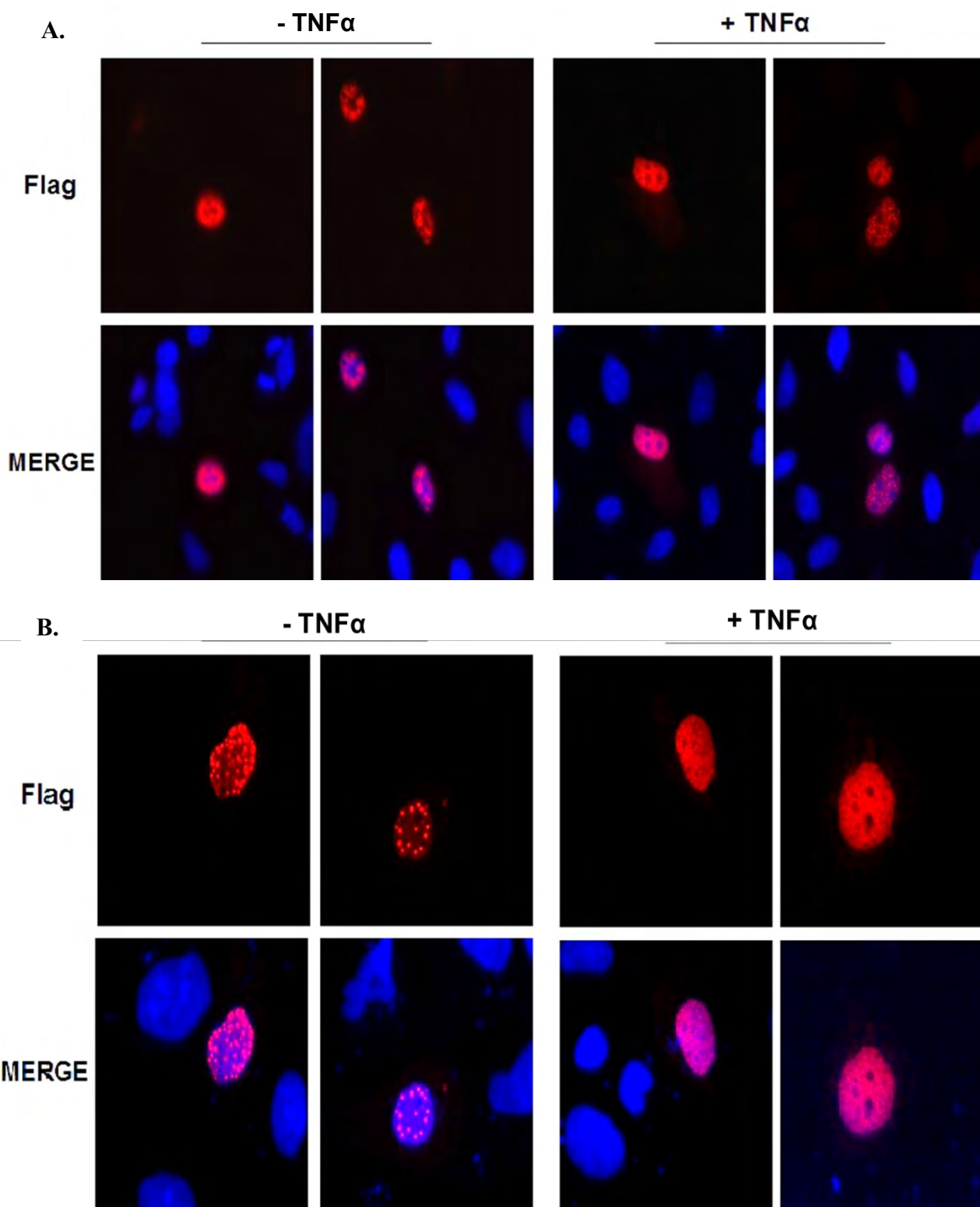


**Εικόνα 18: Επίδραση του παράγοντα TNF-α στην έκφραση γονιδίων στόχων του HIF-2α.** Μέτρηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων της ερυθροποιητίνης (*EPO*) και του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (*PAI-1*) σε κύτταρα Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες απουσία ή παρουσία του TNF-α (10ng/ml) με τη μέθοδο της Real Time PCR. Το πείραμα έγινε 1 φορά. N: Normoxia, H:Hypoxia

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειράματα, συμπεραίνουμε ότι ο TNF-α σε συνθήκες υποξίας αναστέλλει την έκφραση γονιδίων στόχων του HIF-2α (*EPO*, *PAI-1*) χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης του HIF-2α.

#### 4.1.3 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-2α υπό την επίδραση του TNF-α

Προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος μέσω του οποίου ο TNF-α αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF-2, εξετάστηκε η επίδραση του TNF-α στην υποκυτταρική κατανομή του HIF-2α. Κύτταρα HeLa sp και Huh7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση του HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG και στη συνέχεια επώαστηκαν σε νορμοξία παρουσία του TNF-α για 16 ώρες. Ο εντοπισμός του FLAG-HIF-2α στις διάφορες συνθήκες ελέγχθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (**Εικόνα 19**).



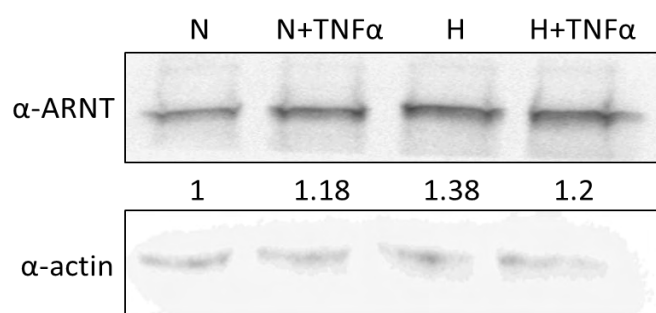
**Εικόνα 19: Επίδραση του TNF- $\alpha$  στον υποκυτταρικό εντοπισμό του HIF-2 $\alpha$ .** Κύτταρα HeLa sp (A) και Huh7 (B) τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για την έκφραση του pFLAG-HIF-2 $\alpha$ -WT, επώαστηκαν σε νορμοξία με 10ng/ml TNF- $\alpha$  για 16 ώρες, μονιμοποιήθηκαν σε καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε DAPI. Το πείραμα έγινε 2 φορές στα κύτταρα Huh7 και 1 φορά στα κύτταρα HeLa sp

Ο HIF-2α ανιχνεύθηκε αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα σε ποσοστό περίπου 75% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, ενώ σε ποσοστό περίπου 25% ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση όπου τα κύτταρα είχαν επωαστεί παρουσία του TNF-α, ο HIF-2α βρέθηκε μέσα στον πυρήνα σε ποσοστό περίπου 90% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο, ενώ σε ποσοστό περίπου 10% ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα στα HeLa sp και σε ποσοστό περίπου 66,6% των κυττάρων που είχαν προσλάβει το πλασμίδιο βρέθηκε μέσα στον πυρήνα, ενώ σε ποσοστό περίπου 33,3% ανιχνεύθηκε τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα στα Huh7. Γεγονός που υποδηλώνει ότι ο TNF-α διατηρεί τον εντοπισμό του HIF-2α στον πυρήνα.

#### 4.1.4 Επίδραση του TNF-α στην αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ARNT

Εφόσον παρατηρήθηκε ότι παρουσία TNF-α σε συνθήκες υποξίας μειώνεται η έκφραση των γονιδίων του HIF-2α ενώ δεν μεταβάλλει τον πυρηνικό εντοπισμό του, η επόμενη υπόθεση ήταν να διερευνηθεί εάν διαταράσσεται η δημιουργία του συμπλόκου του HIF-2α με τον ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) παρουσία του TNF-α, καθώς όπως ήδη είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ο ετεροδιμερισμός με τον ARNT οδηγεί στην πρόσδεση στα HRE (Hypoxia Response Elements) και στην μεταγραφική ενεργοποίηση του παράγοντα.(10)

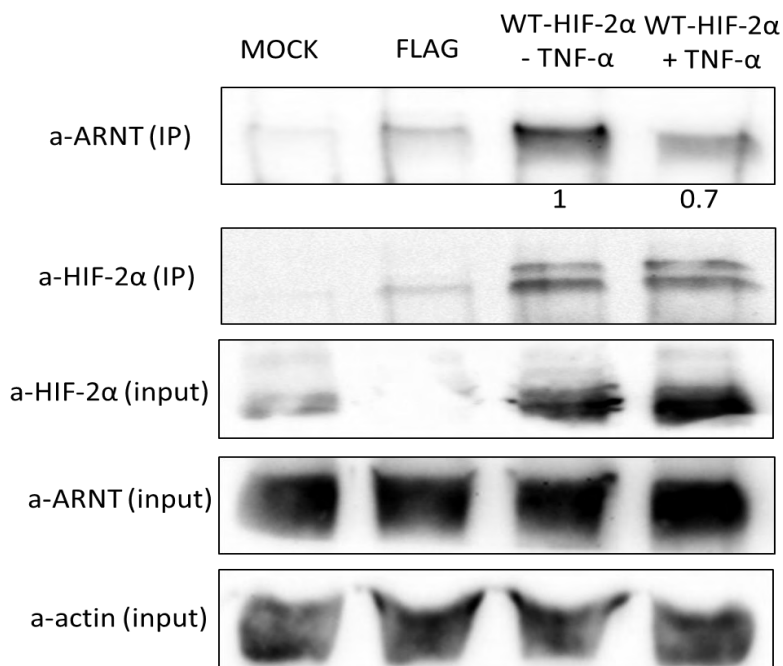
Αρχικά μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση του ARNT παρουσία του TNF-α. Συγκεκριμένα, κύτταρα Huh7 επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας υπό την επίδραση ή όχι του παράγοντα TNF-α (10ng/ml) για 16 ώρες (**Εικόνα 20**).



**Εικόνα 20: Επίδραση του TNF-α στην έκφραση της πρωτεΐνης του ARNT** Ανοσοαποτύπωση με αντισώματα έναντι του ARNT και της ακτίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων Huh7 που επώαστηκαν σε νορμοξία και υποξία (1% O<sub>2</sub>) για 16 ώρες, απουσία ή παρουσία του παράγοντα φλεγμονής TNF-α (10ng/ml). Οι αριθμοί κάτω από την εικόνα αποτελούν τους μέσους όρους 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Παρατηρείται ότι η πρωτεϊνική έκφραση του ARNT δεν μεταβάλλεται παρουσία του TNF-α. Στη συνέχεια, κύτταρα HeLa sp διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που εκφράζει τον HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, στην συνέχεια επώαστηκαν στην νορμοξία για 16h με τον

παράγοντα TNF- $\alpha$  και μελετήθηκε η αλληλεπίδραση με τον ARNT με ανοσοκατακρήμνιση (Εικόνα 21).



**Εικόνα 21: Επίδραση του TNF- $\alpha$  στην αλληλεπίδραση του HIF-2 $\alpha$  με τον ARNT** Κύτταρα HeLa sp διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του FLAG-HIF-2 $\alpha$  και επωάστηκαν σε νορμοξία για 16 ώρες παρουσία και απουσία του παράγοντα TNF- $\alpha$ . Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG. Τα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση των FLAG-HIF-2 $\alpha$  και ARNT. Οι αριθμοί κάτω από την εικόνα αποτελούν τον λόγο της πρωτεΐνης του ARNT που ανιχνεύθηκε να ανοσοκατακρημνίζεται με τον HIF-2 $\alpha$  προς την ποσότητα της πρωτεΐνης του HIF-2 $\alpha$  που ανοσοκατακρημνίζεται. MOCK: συνθήκη χωρίς πλασμίδιο, FLAG: συνθήκη με πλασμιδιακό φορέα pFLAG, WT: αγρίου τύπου HIF-2 $\alpha$  πλήρους μεγέθους.

Ο ARNT συγκατακρημνίστηκε με τον FLAG-HIF-2 $\alpha$ , όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της γνωστής αλληλεπίδρασης (Tian et al.,1997), ωστόσο παρουσία του TNF- $\alpha$  η αλληλεπίδραση του HIF-2 $\alpha$  με τον ARNT μειώνεται.

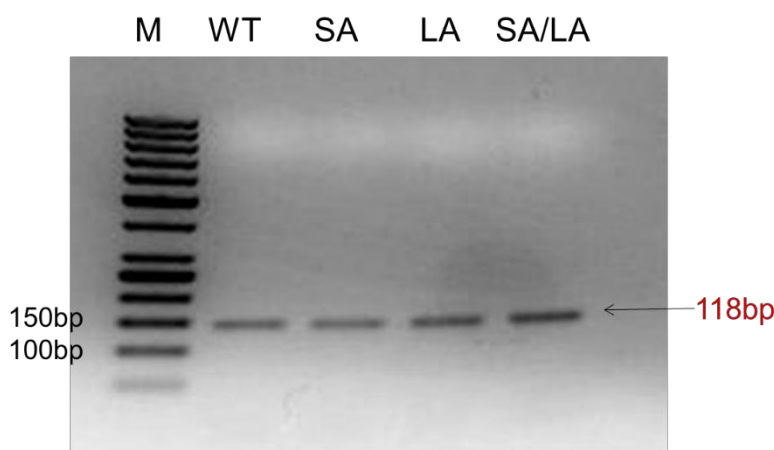
Συμπερασματικά, ο TNF- $\alpha$  αναστέλλει την έκφραση των γονιδίων στόχων του HIF-2 χωρίς να επηρεάζει την έκφρασή του HIF-2 $\alpha$  και τον κυτταρικό του εντοπισμό αλλά μειώνοντας την αλληλεπίδραση του HIF-2 $\alpha$  με τον ARNT.

## 4.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ 640-679 ΤΟΥ HIF-2α ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΓΙΑ ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ NES

### 4.2.1 Κλωνοποίηση του τμήματος cDNA που αντιστοιχεί στην αμινοξική αλληλουχία 640-679 του HIF-2α

Από προηγούμενα πειράματα της ομάδας μας διαθέτουμε τις κατασκευές πλήρους μεγέθους του αγρίου τύπου (WT) HIF-2α καθώς και των μεταλλαγμάτων, του S672A (SA), το οποίο δεν φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2, του L662/667A (LA), στο οποίο έχει χαλάσει το πιθανό σήμα εξόδου από τον πυρήνα, και του S672A/L662/667A (SA/LA), το οποίο φέρει και τις δύο μεταλλάξεις.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με σκοπό την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το τμήμα 640-679 του HIF-2α (WT) καθώς και των μεταλλαγμάτων S672A (SA), L662/667A (LA) και S672A/L662/667A (SA/LA). Η ενίσχυση του τμήματος cDNA του HIF-2α (640-679) καθώς και των μεταλλαγμάτων SA, LA και SA/LA, πιστοποιήθηκε με ηλεκτροφορητική ανάλυση η οποία έδειξε ένα κύριο προϊόν στα 118 bp (**Εικόνα 22**).



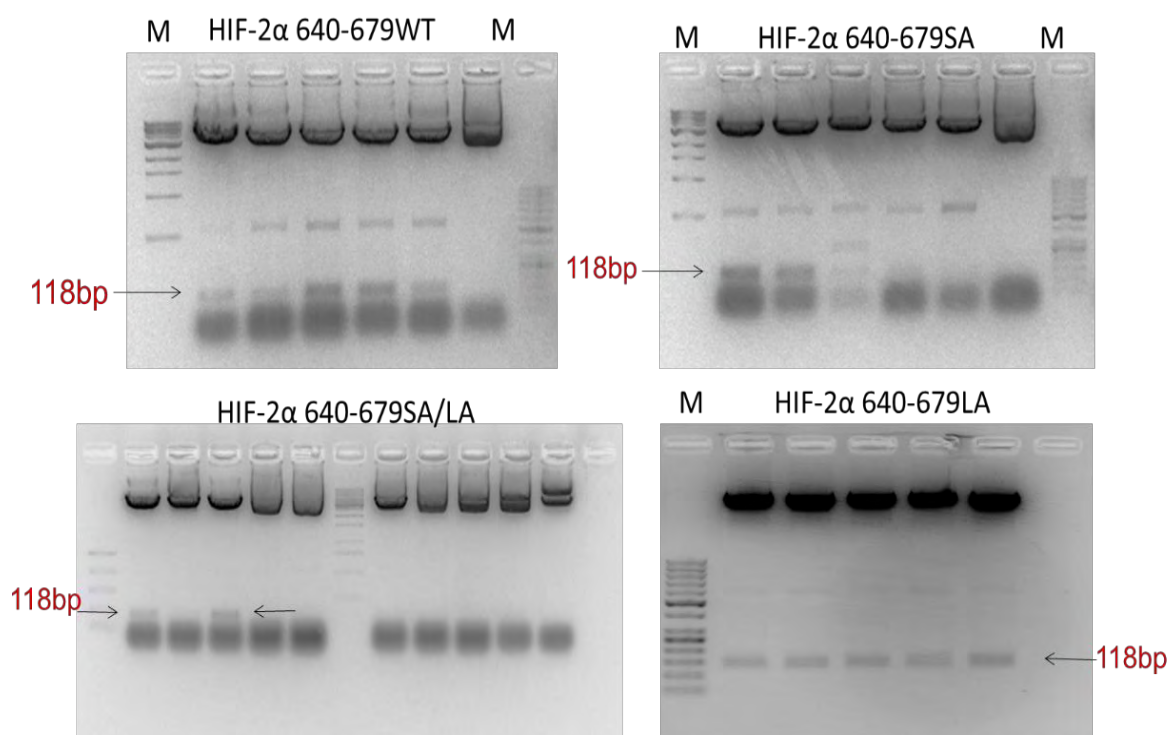
**Εικόνα 22: Ενίσχυση της αλληλουχίας cDNA του HIF-2α(640-679) καθώς και των μεταλλαγμάτων SA, LA, SA/LA με PCR** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR σε 2% w/v πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. M:Μάρτυρας μοριακού βάρους

Ακολούθως, το τμήμα cDNA του HIF-2α απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και τόσο το ίδιο όσο και το πλασμίδιο pEGFP-C1-HIF-2α υποβλήθηκαν σε πέψη με BamHI. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση και τόσο τα τμήματα του HIF-2α (640-679) (118bp) όσο και το τμήμα του φορέα p-EGFP-C1 (4731bp) απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης.

Έπειτα, τα τμήματα cDNA και ο φορέας αναμίχθηκαν με μοριακή αναλογία φορέα:ενθέματος 1:5 και υποβλήθηκαν σε αντίδραση λιγάσης. Με το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης μετασχηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα E.Coli TOP10 τα οποία επιστρώθηκαν σε τρυβλία

καλλιέργειας παρουσία καναμικίνης. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών, οι οποίες επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Από τις υγρές καλλιέργειες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA και οι διαφορετικοί κλώνοι ελέγχθηκαν μέσω δοκιμαστικών πέψεων με το περιοριστικό ένζυμο BamHI για έλεγχο εισαγωγής του ενθέματος cDNA του HIF-2α (640-679) καθώς και των μεταλλαγμάτων SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679), SA/LA-HIF-2α(640-679), στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1. Οι θετικοί για την παρουσία του ενθέματος κλώνοι ελέγχθηκαν μέσω διπλής πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα BglI και XhoI για τον προσανατολισμό του ενθέματος.

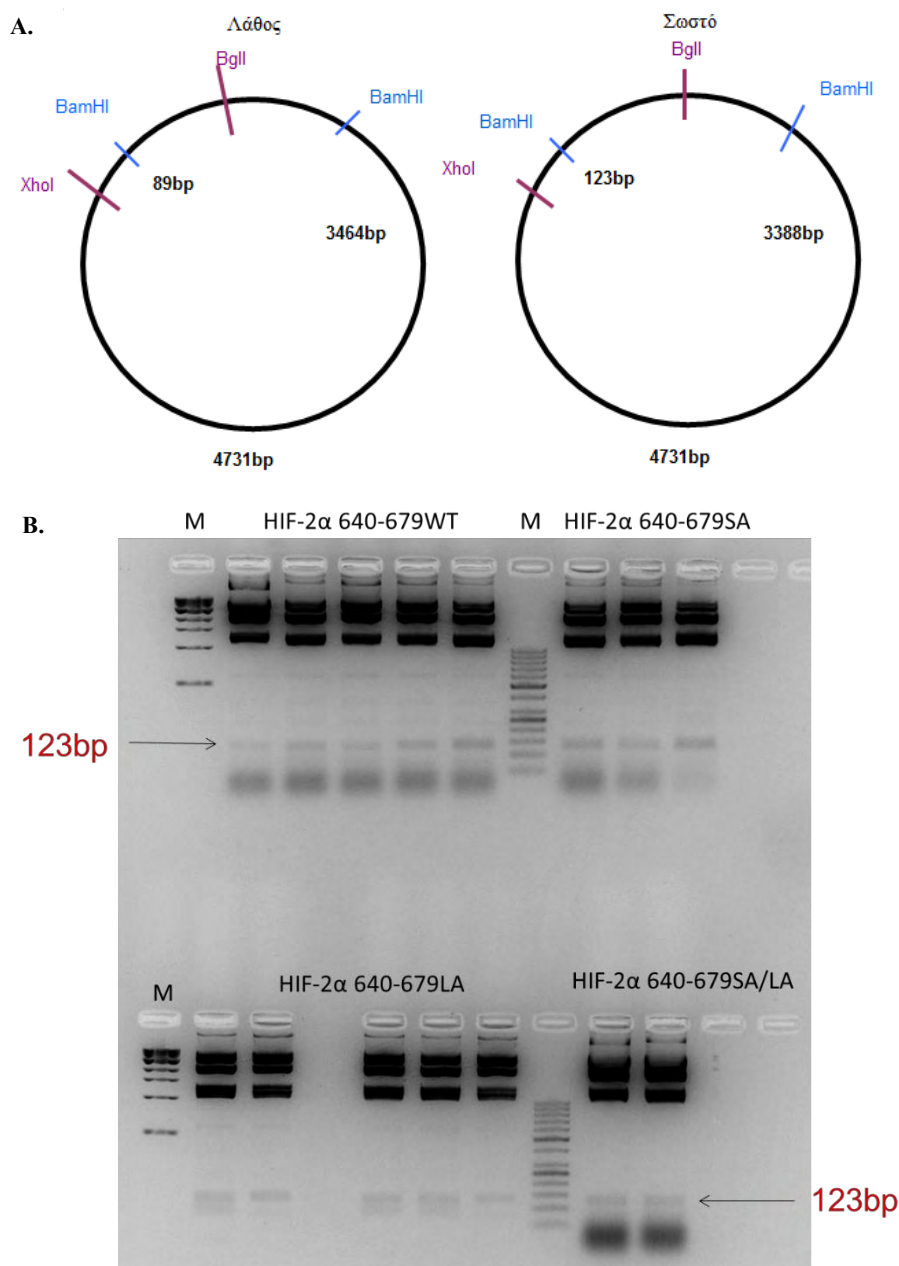
Από τις αποικίες στις οποίες έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA, σε 5 κλώνους του WT-HIF-2α(640-679), σε 3 κλώνους του SA-HIF-2α(640-679), σε 5 κλώνους του LA-HIF-2α(640-679) και σε 2 κλώνους του SA/LA-HIF-2α(640-679) ανιχνεύθηκε πλασμίδιο με το ένθεμα 640-679 ως DNA μεγέθους 118 bp και τον pEGFP-C1 με μέγεθος 4731 bp (**Εικόνα 23**).



**Εικόνα 23: Έλεγχος εισαγωγής του ενθέματος cDNA του WT-HIF-2α(640-679) καθώς και των μεταλλαγμάτων SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679), SA/LA-HIF-2α(640-679) στον πλασμιδιακό φορέα.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR σε 2% w/v πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. M:Μάρτυρας μοριακού βάρους

Έπειτα, στους κλώνους με το ένθεμα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα BglI και XhoI για έλεγχο του προσανατολισμού. Με σωστό προσανατολισμό προέκυψαν 5 κλώνοι του WT-HIF-2α(640-679), 3 κλώνοι του SA-HIF-2α(640-679), 2 κλώνοι του LA-HIF-2α(640-679)

και 2 κλώνοι του SA/LA-HIF-2α(640-679), καθώς έδωσαν τμήματα μεγέθους 123 bp και 3388 bp που αντιστοιχούν στο σωστό προσανατολισμό του ενθέματος (**Εικόνα 24**).

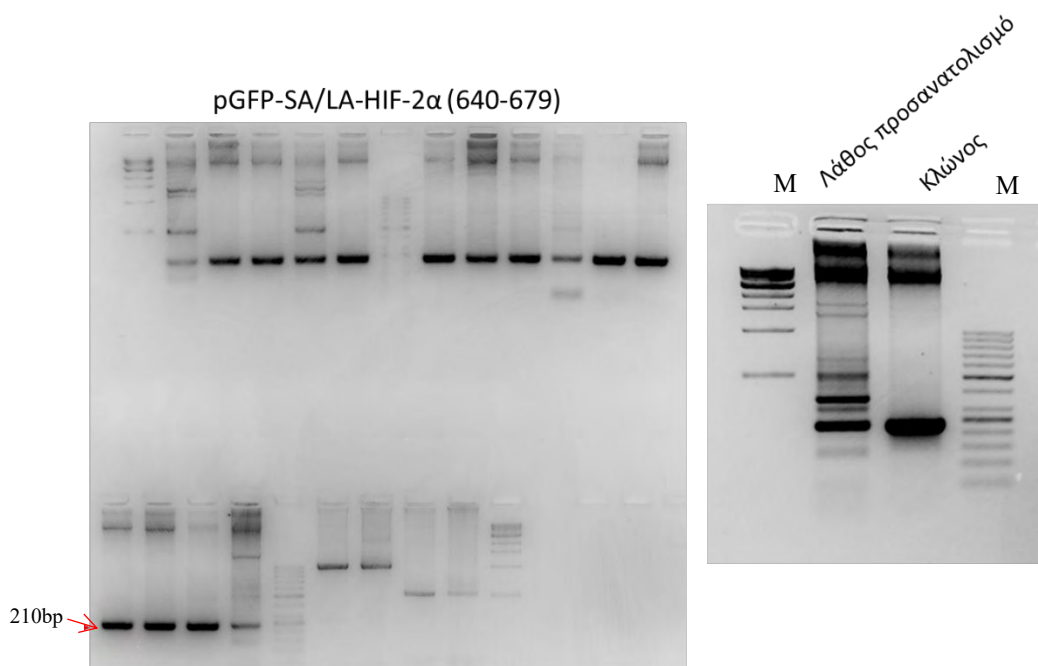


**Εικόνα 24:Α)Χάρτες θέσεων ενζύμων περιορισμού του κλωνοποιημένου cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1. Β) Έλεγχος προσανατολισμού του ενθέματος cDNA του WT-HIF-2α(640-679) καθώς και των μεταλλαγμάτων SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679), SA/LA-HIF-2α(640-679) στον πλασμιδιακό φορέα.** Ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων πέψης διαφόρων κλώνων πλασμιδιακού DNA με διπλή πέψη με BglI και XhoI ,σε 2% w/v πήκτωμα αгарόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. M:Μάρτυρας μοριακού βάρους

Ακολούθως, από τις υγρές καλλιέργειες των θετικών βακτηριακών αποικιών πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με χρήση στήλης και τα πλασμίδια που απομονώθηκαν στάλθηκαν για αλληλούχιση. Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης



διαπιστώθηκε ότι οι κλώνοι του WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679) και LA-HIF-2α(640-679) φέρουν το σωστό ένθεμα και τον σωστό προσανατολισμό. Ο κλώνος SA/LA-HIF-2α(640-679) διαπιστώθηκε να φέρει λάθος προσανατολισμό στο ένθεμά του, οπότε και δοκιμάστηκαν νέοι κλώνοι για την εύρεση ενθέματος. Στους κλώνους στους οποίους βρέθηκε ένθεμα πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές για τμήμα του φορέα pEGFP-C1 και το άκρο 679 του ενθέματος. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και έδωσε ένα τμήμα μεγέθους 210 bp το οποίο συγκρίθηκε με το προϊόν PCR από τον κλώνο με το λάθος προσανατολισμό για να διαπιστωθεί ότι φέρει σωστή κατεύθυνση (Εικόνα 25).



**Εικόνα 25: Έλεγχος προσανατολισμού του ενθέματος cDNA του SA/LA-HIF-2α(640-679) με PCR**

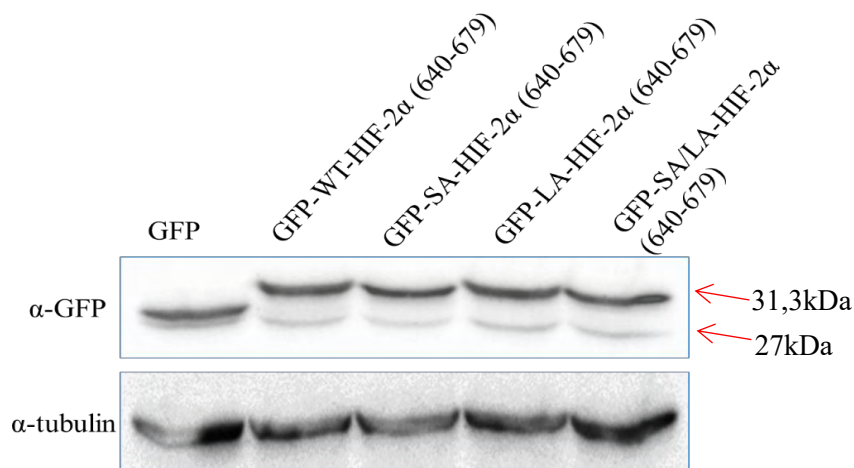
Ηλεκτροφορητική ανάλυση του προϊόντος της PCR σε 2% w/v πήκτωμα αгарόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Κλώνος ο οποίος έδωσε μόνο ένα προϊόν στην PCR, συγκρίθηκε με το προϊόν PCR του κλώνου που έφερε λάθος προσανατολισμό, σύμφωνα με την αλληλούχιση. M:Μάρτυρας μοριακού βάρους

Τέλος, από την θετική υγρή καλλιέργεια βακτηρίων πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με χρήση στήλης.

#### 4.2.2 Έλεγχος της έκφρασης των κλωνοποιημένων τμημάτων του HIF-2α (640-679)

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν τα τμήματα που κλωνοποιήθηκαν εκφράζονται, κύτταρα HeLa sp διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση του WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679) σε σύντηξη με τον επίτοπο GFP και ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση (Εικόνα 26).



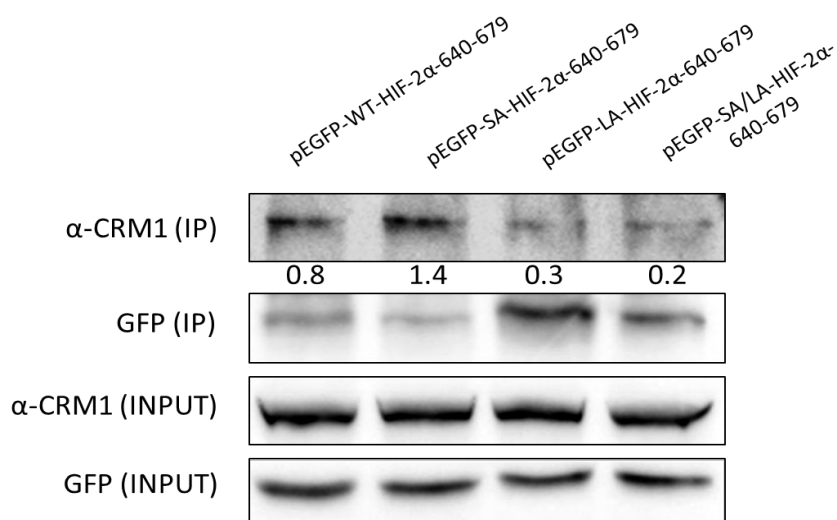


**Εικόνα 26: Έλεγχος της έκφρασης των κλωνοποιημένων τμημάτων WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679)** Ανοσοαποτύπωση με ορό έναντι της GFP και αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης ολικού εκχυλίσματος κυττάρων HeLa sp, έπειτα από διαμόλυνση με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τα τμήματα 640-679 του WT-HIF-2α, του SA-HIF-2α, του LA-HIF-2α και του SA/LA-HIF-2α σε σύντηξη με GFP. MW<sub>GFP</sub>: 27kDa, MW<sub>κλωνοποιημένων τμημάτων</sub>: 31kDa

Η ανάλυση με ανοσοαποτύπωση έδειξε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του τμήματος του αγρίου τύπου του HIF-2α καθώς και των τμημάτων των μεταλλαγμάτων εκφράζονται στα ίδια επίπεδα στα κύτταρα μας. Παρατηρούμε ωστόσο και μία μικρή έκφραση μόνο της GFP πρωτεΐνης σε όλες τις συνθήκες στα κύτταρά μας.

#### 4.2.3 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των κλωνοποιημένων τμημάτων WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679) με την εξαπορτίνη 1 (CRM1)

Για να ελεγχθεί εάν η αλληλουχία στην οποία πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση είναι επαρκής για να λειτουργεί ως σήμα πυρηνικής εξόδου, ελέγξαμε εάν η αλληλουχία αυτή αλληλεπιδρά με την εξαπορτίνη 1 (CRM1), η οποία είναι υπεύθυνη για την έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με ορό κουνελιού έναντι της GFP. Συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa sp διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση του WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679) σε σύντηξη με τον επίτοπο GFP και μελετήθηκε η αλληλεπίδραση με τη CRM1 με ανοσοκατακρήμνιση (Εικόνα 28).



**Εικόνα 28:** Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των κλωνοποιημένων τμημάτων WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679) με την εξαπορτίνη 1 (CRM1). Κύτταρα HeLa sr διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο για την έκφραση του WT-HIF-2α(640-679), SA-HIF-2α(640-679), LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με ορό έναντι της GFP. Τα συνολικά κυτταρικά εκχυλίσματα (INPUT) και τα ανοσοκατακρημνίσματα (IP) αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση για την ανίχνευση των κλωνοποιημένων GFP-HIF-2α και CRM1. Οι αριθμοί κάτω από την εικόνα αποτελούν τον λόγο της πρωτεΐνης της CRM1 που ανιχνεύθηκε να ανοσοκατακρημνίζεται με τα GFP μεταλλάγματα του HIF-2α προς την ανιχνεύσιμη πρωτεΐνη των GFP μεταλλαγμάτων του HIF-2α που ανοσοκατακρημνίστηκαν.

Από την ανάλυση με ανοσοκατακρήμνιση παρατηρούμε ότι η CRM1 συγκατακρημνίστηκε με τον αγρίου τύπου HIF-2α(640-679) καθώς και με το μετάλλαγμα SA-HIF-2α(640-679). Ωστόσο, παρατηρούμε ότι δεν συγκατακρημνίστηκε με τα μεταλλάγματα LA-HIF-2α(640-679) και SA/LA-HIF-2α(640-679), στα οποία έχουν μεταλλαχθεί οι Leu του πιθανού NES και έτσι αυτό δεν είναι λειτουργικό. Το αποτέλεσμα του παραπάνω πειράματος συμφωνεί με τα αποτελέσματα του φθορισμού (**Εικόνα 27**).

Συνολικά, τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι η γειτονική στην Ser672 αλληλουχία την οποία μελετήσαμε είναι επαρκής για να αποτελεί ένα λειτουργικό σήμα πυρηνικής εξαγωγής NES.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απόκριση του οργανισμού σε συνθήκες υποξίας περιλαμβάνει ένα περίπλοκο βιοχημικό σύστημα στο οποίο κυρίαρχο ρόλο έχουν οι επαγόμενοι από την υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (HIF). Είναι γνωστό ότι σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου οι HIF εκφράζονται συνεχώς, υδροξυλιώνονται από τις PHDs και αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα, ενώ σε συνθήκες υποξίας, τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου καθιστούν τις PHDs ανενεργές, σταθεροποιώντας τους HIF και ενεργοποιώντας την μεταγραφική τους δράση. Ανεξάρτητα από τις συνθήκες οξυγόνου, οι HIF ρυθμίζονται και σε επίπεδο μεταγραφής, πρωτεϊνικής σταθερότητας και δραστηριότητας από αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες, κυτταροκίνες και πρωτεϊνικές κινάσες.

### 5.1 Επίδραση του TNF-α στη ρύθμιση του HIF-2α

Οι HIF συμμετέχουν σε φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η εμβρυογένεση, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι συμπαγείς καρκινικοί όγκοι, με διακριτή δράση για την κάθε ισομορφή. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στους συμπαγείς όγκους, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς είναι σημαντικά μειωμένη και τα επίπεδα των HIF αυξημένα ενώ σ' αυτό το μικροπεριβάλλον του όγκου αναπτύσσονται συνήθως και συνθήκες φλεγμονής, λόγω της πληθώρας κυττάρων που βρίσκονται συγκεντρωμένα εκεί. Έτσι, η υποξία και η φλεγμονή φαίνεται να συνυπάρχουν σε αρκετά σημεία στην καρκινογένεση (69).

Στις συνθήκες αυτές παράγονται αρκετές κυτταροκίνες, μεταξύ των οποίων και ο TNF-α. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α) είναι μια κυτταροκίνη που εκφράζεται σε συνθήκες φλεγμονής και σε όγκους και μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών της διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία του όγκου. Ωστόσο η επικοινωνία του TNF-α με τους HIFs δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί όπου λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα να υπάρχουν για την αλληλεπίδραση με τον HIF-1α ενώ η σχέση με τον HIF-2α δεν έχει μελετηθεί.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διερευνήθηκε η ρύθμιση της ισομορφής του HIF-2α από τον προφλεγμονώδη παράγοντα TNF-α χρησιμοποιώντας τη σειρά καρκινικών ηπατικών κυττάρων Huh7 και την σειρά καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας HeLa sp. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF-α) προκάλεσε μείωση της έκφρασης ειδικών γονιδίων στόχων (*EPO*, *PAI-1*) του HIF-2α σε υποξία ενώ δεν επηρέασε τα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενα πειράματα της ομάδας μας όπου κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 τα οποία επώαστηκαν με τον TNF-α, εμφάνισαν μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α χωρίς ωστόσο να επηρεαστούν τα πρωτεϊνικά του επίπεδα (*Διδακτορική διατριβή Ευανθίας Πάγγου, 2016*).

Από τον μοριακό μηχανισμό ρύθμισης των HIF, είναι γνωστό ότι η μείωση της μεταγραφικής τους ενεργότητας μπορεί να οφείλεται είτε σε μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού της α υπομονάδας τους και έξοδό της από τον πυρήνα, είτε σε αναστολή της αλληλεπίδρασης της α με

τη β υπομονάδα (ARNT), καθώς και στη μείωση της συγγένειας με τους άλλους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές (CBP, p300, USF2, ELK-1, NEMO). Για το λόγο αυτό, προχωρήσαμε στη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-2α και παρατηρήσαμε πως η παρουσία του TNF-α δεν μεταβάλλει τον πυρηνικό εντοπισμό του HIF-2α.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του HIF-2α με τον ARNT. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης όπου κύτταρα HeLa sp διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που εκφράζει τον πλήρους μεγέθους HIF-2α σε σύντηξη με τον επίτοπο FLAG, επώαστηκαν με TNF-α σε συνθήκες νορμοξίας για 16 ώρες και υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αντί-FLAG, δείξαμε ότι παρουσία του TNF-α μειώνεται η αλληλεπίδραση με τον ARNT. Βρήκαμε έτσι για πρώτη φορά ότι ο TNF-α μειώνει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α μειώνοντας την αλληλεπίδραση με τον ARNT. Στη βιβλιογραφία, η σχέση του TNF-α με την ισομορφή HIF-1α είναι αμφιλεγόμενη. Παρατηρούνται μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο TNF-α έχει θετική ρύθμιση του HIF-1α (65),(66), (67), όπου εμπλέκονται κυρίως τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν ο υποδοχέας TNR4 (Toll-like receptor 4) και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB. Μια σειρά από άλλες μελέτες υποστηρίζουν την αρνητική ρύθμιση του HIF-1α από τον TNF-α. Πιο συγκεκριμένα, σε οστεοπρογονικά κύτταρα βρέθηκε ότι η πρόκληση φλεγμονής από τον TNF-α ενεργοποιεί τον NF-κB, ο οποίος ανταγωνίζεται την πρόσδεση του συμπαραγόντα p300 στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του HIF-1, μειώνοντας έτσι τη μεταγραφική του δράση (70). Επίσης, πειράματα σε κύτταρα βρογχικών ΛΜΚ έδειξαν ότι η επίδραση του TNF-α έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του HIF-1α, μέσω του μονοπατιού του NF-κB, και την μείωση της μεταγραφικής του δράσης, μέσω αναστολής της αλληλεπίδρασης με τον ARNT και της πρόσδεσης στα HRE (58). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνητών και δείχνουν ότι ο HIF-1α και ο HIF-2α διαθέτουν έναν κοινό μηχανισμό ρύθμισης από τον TNF-α.

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει δείξει ότι ο TNF-α σε κύτταρα HEK293 και HeLa μεταβάλλει τόσο του mRNA όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF-1β, μέσω του μονοπατιού του NF-κB (71). Για αυτό το λόγο, ελέγξαμε στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ARNT και διαπιστώσαμε ότι δεν προκαλεί μεταβολή. Συμπεραίνουμε έτσι ότι ο TNF-α δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ARNT παρά μόνο την αλληλεπίδρασή του με τον HIF-2α.

## **5.2 Λειτουργική μελέτη των μεταλλαγμάτων του HIF-2α που καταργούν το πιθανό NES**

Πρόσφατα αδημοσίευτα αποτελέσματα της ομάδας μας, δείχνουν ότι ο HIF-2α είναι άμεσος στόχος φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Πιο αναλυτικά, βρέθηκε ότι οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον HIF-2α στη Ser672. Η φωσφορυλίωση αυτή επάγει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-2α και την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Τα παραπάνω

ανέδειξαν την ύπαρξη ενός άτυπου υδρόφοβου σήματος πυρηνικής εξαγωγής (NES) κοντά στη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2. Υποδεικνύεται, έτσι, ότι η φωσφορυλίωση στη θέση Ser672 από τις ERK1/2 καλύπτει το NES με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση της εξπορτίνης CRM1 στον HIF-2α και η εξαγωγή του από τον πυρήνα. Στη συνέχεια, με πειράματα μεταλλαξιγένεσης στον αγρίου τύπου πλήρους μεγέθους HIF-2α διαπιστώθηκε ότι η αλληλουχία (NES) είναι αναγκαία για την έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα (**Gkotinakou et al., unpublished data**).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν η γειτονική αλληλουχία στη Ser672 είναι επαρκής για να αποτελεί ένα λειτουργικό NES του HIF-2α. Έτσι, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του τμήματος 640-679 του αγρίου τύπου HIF-2α, το οποίο φέρει τη θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, καθώς και των μεταλλαγμάτων του, α) του τμήματος 640-679 του SA-HIF-2α, στο οποίο καταργείται η θέση φωσφορυλίωσης, β) του τμήματος 640-679 του LA-HIF-2α, στο οποίο έχει χαλάσει η αλληλουχία του πιθανού NES, και γ) του τμήματος 640-679 του SA/LA-HIF-2α, το οποίο φέρει και τις δύο μεταλλάξεις, στον πλασμιδιακό φορέα p-EGFP-C1. Αφού ελέγξαμε ότι όλες οι παραπάνω κατασκευές εκφράζονται στα κύτταρά μας, προχωρήσαμε στον έλεγχο της λειτουργίας τους. Έτσι, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης των κλωνοποιημένων τμημάτων του HIF-2α με ορό κουνελιού έναντι της GFP για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης με την CRM1, η οποία είναι υπεύθυνη για την έξοδο του HIF-2α από τον πυρήνα. Βρέθηκε ότι η CRM1 αλληλεπιδρά λιγότερο με τα μεταλλάγματα LA-HIF-2α (640-679) και SA/LA-HIF-2α (640-679), και περισσότερο με το μετάλλαγμα SA-HIF-2α (640-679) σε σχέση με τον WT-HIF-2α (640-679).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία την ύπαρξη μιας αλληλουχίας σήματος πυρηνικής εξόδου για τον HIF-2α. Η πρώτη αυτή προσέγγιση μας έδειξε ότι η γειτονική αλληλουχία στην Ser672, η οποία αποτελεί θέση φωσφορυλίωσης από τις ERK1/2, βρέθηκε να είναι πέραν από αναγκαία και επαρκής για να αποτελεί ένα λειτουργικό σήμα πυρηνικής εξόδου, NES, για την πρωτεΐνη του HIF-2α. Θα ήταν ενδιαφέρον σε μελλοντικά πειράματα να πραγματοποιηθεί επίσης, και έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού των παραπάνω τμημάτων με μικροσκοπία φθορισμού.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kumar, H. & Choi, D. K. (2015). Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm*, 2015, 584758.
2. Schofield, C.J. & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004 May; 5(5):343-54
3. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 5510-4
4. Wang, G. L. & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270, 1230-7.
5. Dery, M. A., Michaud, M. D. & Richard, D. E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 535-40.
6. Tian, H., Mcknight, S. L. & Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev*, 11, 72-82.
7. Flamme, I., Frohlich, T., Von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. & Risau, W. (1997). HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev*, 63, 51-60.
8. Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y. Z., Pray-Grant, M., Perdew, G. H. & Bradfield, C. A. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*, 272, 8581-93.
9. Li, H., Ko, H. P. & Whitlock, J. P. (1996). Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem*, 271, 21262-7.
10. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4273-8.
11. Luo, J. C. & Shibuya, M. (2001). A variant of nuclear localization signal of bipartite-type is required for the nuclear translocation of hypoxia inducible factors (1alpha, 2alpha and 3alpha). *Oncogene*, 20, 1435-44.
12. Mohlin, S., Hamidian, A., Von Stedingk, K., Bridges, E., Wigerup, C., Bexell, D. & Pahlman, S. (2015). PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res*, 75, 4617-28.
13. Wiesener, M. S., Jurgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Horstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S., Maxwell, P. H. & Eckardt, K. U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*, 17, 271-3.
14. Taylor, S. E., Bagnall, J., Mason, D., Levy, R., Fernig, D. G. & See, V. (2016). Differential sub-nuclear distribution of hypoxia-inducible factors (HIF)-1 and -2 alpha impacts on their stability and mobility. *Open Biol*, 6.
15. Rathmell, W.K. & Chen, S. (2008). VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8 (1):63-73
16. Maynard, M. A., Evans, A. J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A. & Ohh, M. (2005). Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*, 19, 1396-406.
17. Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y. & Imura, N. (2001). Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 808-13.
18. Zhang, P., Yao, Q., Lu, L., Li, Y., Chen, P. J. & Duan, C. (2014). Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep*, 6, 1110-21.
19. Hankinson, O. (2008). Why does ARNT2 behave differently from ARNT? *Toxicol Sci*, 103, 1-3.
20. Rankin, E. B. & Giaccia, A. J. (2016). Hypoxic control of metastasis. *Science*, 352, 175-80.
21. Mandl, M. & Depping, R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? *Mol Med*, 20, 215-20.

22. Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D. & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J.*, 22(16):4082-4090.
23. Koivunen, P., Hirsila, M., Remes, A.M., Hassinen, I.E., Kivirikko, K.I. & Myllyharju, J. (2007). Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem*, 282, 4524-32.
24. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. & Kaelin, W.G. Jr (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, 292, 464-8.
25. Masson, N., William, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*, 20, 5197-206.
26. Foxler, D.E., Bridge, K.S., James, V., Webb, T.M., Mee, M., Wong, S.C., Feng, Y., Constantin-Teodosiu, D., Petursdottir, T.E., Bjornsson, J., Ingvarsson, S., Ratcliffe, P.J., Longmore, G.D. & Sharp, T.V. (2012). The LIMD1 protein bridges an association between the prolyl hydroxylases and VHL to repress HIF-1 activity. *Nat Cell Biol*, 14, 201-8.
27. Masson, N., Singleton, R. S., Sekirnik, R., Trudgian, D. C., Ambrose, L. J., Miranda, M. X., Tian, Y. M., Kessler, B. M., Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. (2012). The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep*, 13, 251-7.
28. Heyman, S.N., Rosen, S. & Rosenberger, C. (2011). Hypoxia-inducible factors and the prevention of acute organ injury. *Critical Care*, 15:209
29. Takeda, N., O'dea, E. L., Doedens, A., Kim, J. W., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M. C., Hoffmann, A. & Johnson, R. S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev*, 24, 491-501.
30. Alam, M. W., Persson, C. U., Reinbothe, S., Kazi, J. U., Ronnstrand, L., Wigerup, C., Ditzel, H. J., Lykkesfeldt, A. E., Pahlman, S. & Jogi, A. (2016). HIF2 $\alpha$  contributes to antiestrogen resistance via positive bilateral crosstalk with EGFR in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7, 11238-50.
31. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C. & Semenza, G.L. (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, 21, 3995-4004.
32. Gao, W., Li, J. Z., Chan, J. Y., Ho, W. K. & Wong, T. S. (2012). mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. *ISRN Otolaryngol*, 2012, 953089.
33. Nayak, B. K., Feliars, D., Sudarshan, S., Friedrichs, W. E., Day, R. T., New, D. D., Fitzgerald, J. P., Eid, A., Denapoli, T., Parekh, D. J., Gorin, Y. & Block, K. (2013). Stabilization of HIF-2 $\alpha$  through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene*, 32, 3147-55.
34. Joshi, S., Singh, A. R., Zulcic, M. & Durden, D. L. (2014). A macrophage-dominant PI3K isoform controls hypoxia-induced HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  stability and tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Mol Cancer Res*, 12, 1520-31.
35. Chen, R., Xu, M., Hogg, R. T., Li, J., Little, B., Gerard, R. D. & Garcia, J. A. (2012). The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/Sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling. *J Biol Chem*, 287, 30800-11.
36. Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 202-10.
37. Van Hagen, M., Overmeer, R. M., Abolvardi, S. S. & Vertegaal, A. C. (2010). RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$ . *Nucleic Acids Res*, 38, 1922-31.
38. To, K. K., Sedelnikova, O. A., Samons, M., Bonner, W. M. & Huang, L. E. (2006). The phosphorylation status of PAS-B distinguishes HIF-1 $\alpha$  from HIF-2 $\alpha$  in NBS1 repression. *EMBO J*, 25, 4784-94.
39. Lancaster, D. E., Mcneill, L. A., McDonough, M. A., Aplin, R. T., Hewitson, K. S., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. & Schofield, C. J. (2004). Disruption of dimerization and substrate phosphorylation inhibit factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) activity. *Biochem J*, 383, 429-37.

40. Pangou, E., Befani, C., Mylonis, I., Samiotaki, M., Panayotou, G., Simos, G. & Liakos, P. (2016). HIF-2 $\alpha$  phosphorylation by CK1 $\delta$  promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia. *J Cell Sci*.
41. Gradin, K., Takasaki, C., Fujii-Kuriyama, Y. & Sogawa, K. (2002). The transcriptional activation function of the HIF-like factor requires phosphorylation at a conserved threonine. *J Biol Chem*, 277, 23508-14.
42. Roskoski, R.Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66, 105-43
43. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S. & Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*, 281, 33095-106.
44. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. (2008). Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by MAPK. *J Biol Chem*, 283, 27620-7.
45. Pawlus, M. R., Wang, L., Murakami, A., Dai, G. & Hu, C. J. (2013). STAT3 or USF2 contributes to HIF target gene specificity. *PLoS One*, 8, e72358.
46. Muller, J. M., Krauss, B., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A. & Rupec, R. A. (1997). Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 272, 23435-9.
47. Aprelikova, O., Wood, M., Tackett, S., Chandramouli, G. V. & Barrett, J. C. (2006). Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection. *Cancer Res*, 66, 5641-7.
48. Hu, C. J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H. & Simon, M. C. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ . *Mol Biol Cell*, 18, 4528-42.
49. Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. & Peet, D. J. (2005). Activity of hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  is regulated by association with the NF- $\kappa$ B essential modulator. *J Biol Chem*, 280, 14240-51.
50. Pawlus, M. R., Wang, L., Ware, K. & Hu, C. J. (2012). Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF2 $\alpha$ ) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol*, 32, 4595-610.
51. Rahl, P.B. & Young, R.A. (2014). MYC and transcription elongation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4, a020990
52. Dang, C. V., Kim, J. W., Gao, P. & Yuste, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 51-6.
53. Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. (2012). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*, 12, 9-22.
54. Shay, J. E. & Celeste Simon, M. (2012). Hypoxia-inducible factors: crosstalk between inflammation and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 389-94.
55. Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V. & Johnson, R. S. (2014). HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*, 41, 518-28.
56. Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., Johnson, R. S. & Goldrath, A. W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol*, 14, 1173-82.
57. Hua, S. & Dias, T. H. (2016). Hypoxia-Inducible Factor (HIF) as a Target for Novel Therapies in Rheumatoid Arthritis. *Front Pharmacol*, 7, 184.
58. Tsapournioti, S., Mylonis, I., Hatziefthimiou, A., Ioannou, M. G., Stamatiou, R., Koukoulis, G. K., Simos, G., Molyvdas, P. A. & Paraskeva, E. (2013). TNF $\alpha$  induces expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein but inhibits hypoxic stimulation of HIF-1 transcriptional activity in airway smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 228, 1745-53.
59. Wann, A. K., Thompson, C. L., Chapple, J. P. & Knight, M. M. (2013). Interleukin-1 $\beta$  sequesters hypoxia inducible factor 2 $\alpha$  to the primary cilium. *Cilia*, 2, 17.
60. Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119, 651-65.
61. Baxter, G.T., Kuo, R.C., Jupp, O.J., Vandenabeele, P. & MacEwan, D.J. (1999). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem*, 274, 9539-9547.



62. Wang, C., Yu, X., Yan, Y., Yang, W., Zhang, S., Xiang, Y., Zhang, J. & Wang, W. (2017). Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a key contributor to intervertebral disc degeneration. *Acta Biochim Biophys Sin*, 49, 1–13.
63. Wang, X. & Lin, Y., (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin.*, 29, 1275–1288.
64. Ferrajoli, A., Keating, M.J., Manshouri, T., Giles F.J., Dey, A., Estrov, Z., Koller, C.A., Kurzrock, R., Thomas, D.A., Faderl, S., Lerner, S., O'Brien, S. & Albitar, M. (2002). The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, 100, 1215-9.
65. Tewari, R., Choudhury, S. R., Ghosh, S., Mehta, V. S. & Sen, E. (2012). Involvement of TNF $\alpha$ -induced TLR4-NF-kappaB and TLR4-HIF-1 $\alpha$  feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. *J Mol Med (Berl)*, 90, 67-80.
66. Tang, M., Tian, Y., Li, D., Lv, J., Li, Q., Kuang, C., Hu, P., Wang, Y., Wang, J., Su, K. & Wei, L. (2014). TNF- $\alpha$  mediated increase of HIF-1 $\alpha$  inhibits VASP expression, which reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury (ALI). *PLoS One*, 9, e102967.
67. Remels, A. H., Gosker, H. R., Verhees, K. J., Langen, R. C. & Schols, A. M. (2015). TNF- $\alpha$ -induced NF-kappaB activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1 $\alpha$ . *Endocrinology*, 156, 1770-81.
68. Goryo, K., Torii, S., Yasumoto, K. & Sogawa, K. (2011). Tumour necrosis factor-alpha suppresses the hypoxic response by NF-kappaB-dependent induction of inhibitory PAS domain protein in PC12 cells. *J Biochem*, 150, 311-8.
69. Eltzschig, H.K. & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*, 364, 656-665
70. Mendonca, G.V., Pereira, F.D. & Fernall, B. (2011). Effects of Combined Aerobic and Resistance Exercise Training in Adults with and Without Down Syndrome. *Arch Phys Med and Rehabil.* 92, 37-45
71. van Uden, P., Kenneth, N.S., Webster, R., Müller, H.A., Mudie, S. & Rocha, S. (2011) Evolutionary Conserved Regulation of HIF-1 $\beta$  by NF-k $\beta$ . *PLoS Genet*, 7, e1001285.
72. Leonardi, G. C., Candido, S., Cervello, M., Nicolosi, D., Raiti, F., Travali, S., Spandidos, D. A. & Libra, M. (2012). The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol*, 40, 1733-47.
73. Dengler, V., Galbraith, M. & Espinosa, J.M. (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49, 1–15.